

Das Netzwerk der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle in *E. coli*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie und Geografie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Juliane Weski

aus Tübingen

April 2010

Angaben zur Prüfung

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie II der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. M. Ehrmann

2. Gutachter: Prof. R. Hensel

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof'in P. Nalbant

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.2010

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS	9
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
1 EINLEITUNG	13
1. 1 Bedeutung der Proteinqualitätskontrolle	13
1. 2 Die Zellhülle von <i>E. coli</i>	14
1. 3 Biogenese von Außenmembranproteinen	15
1. 3. 1 SecYEG-Translocon	15
1. 3. 2 BAM-Komplex	17
1. 4 Faltungsfaktoren im Periplasma	18
1. 4. 1 Molekulare Chaperone	18
1. 4. 2 Prolinisomerasen	20
1. 4. 3 Oxidoreduktasen	23
1. 4. 4 Proteasen	26
1. 4. 4. 1 Serinproteasen	26
1. 4. 4. 2 Metalloproteasen	29
1. 5 Stressregulation im Periplasma	31
1. 5. 1 Cpx-System	31
1. 5. 2 σ^E -abhängiger Signalweg	32
2 ZIELSETZUNG	34
3 MATERIAL UND METHODEN	35
3. 1 Material	35
3. 1. 1 Nährmedien	35
3. 1. 2 Antibiotika	36
3. 1. 3 Weitere Medienzusätze	36
3. 1. 4 Bakterienstämme	36
3. 1. 5 Vektoren und Plasmide	40

3. 1. 6 Oligonukleotide	41
3. 1. 7 Antikörper	42
3. 1. 8 Proteine und Enzyme	43
3. 1. 9 Protein- und Nukleinsäurestandards	43
3. 1. 10 Komplettsysteme	43
3. 1. 11 Allgemeine Chemikalien	44
3. 1. 12 Verbrauchsmaterialien	44
3. 1. 13 Geräte	44
3. 1. 14 Software	45
3. 2 Methoden	46
3. 2. 1 Molekularbiologische Methoden	46
3. 2. 1. 1 Allgemeine Methoden	46
3. 2. 1. 2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
3. 2. 1. 3 Oligomutagenese	46
3. 2. 1. 4 Kolonie-PCR	47
3. 2. 1. 5 RNA-Isolation	47
3. 2. 1. 6 cDNA-Synthese	48
3. 2. 1. 7 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	48
3. 2. 2 Mikrobiologische Methoden	50
3. 2. 2. 1 Anzucht von <i>E. coli</i>	50
3. 2. 2. 2 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	51
3. 2. 2. 3 Herstellung des P1-Lysats nach Miller	51
3. 2. 2. 4 P1-Transduktion nach Miller	51
3. 2. 3 Proteinbiochemische Methoden	52
3. 2. 3. 1 β -Galactosidase-Assay	52
3. 2. 3. 2 Gesamtproteinisolierung aus <i>E. coli</i>	53
3. 2. 3. 3 Kalter osmotischer Schock	53
3. 2. 3. 4 Membranpräparation	54
3. 2. 3. 5 SDS-PAGE	54
3. 2. 3. 6 Coomassie-Färbung	55
3. 2. 3. 7 Western-Blot	55

3. 2. 3. 8 Immundetektion von Proteinen	56
3. 2. 3. 9 Gentle Lysis-Western Blot	56
3. 2. 3. 10 Reinigung von Tsp mit His-Tag	57
3. 2. 3. 11 Aktivitätstest mit einem pNA-Peptid	58
3. 2. 3. 12 Abbau von Proteinen durch DegP und Tsp	59
3. 2. 3. 13 Herstellung und Inkubation von Peptidbibliotheken	59
3. 2. 4 In vivo Experimente	60
3. 2. 4. 1 Phenotype MicroArray TM	60
3. 2. 4. 2 Spot-Test	60
4 ERGEBNISSE	61
4. 1 Identifizierung synthetischer Phänotypen	61
4. 1. 1 Synthetische Phänotypen unter optimalen Wachstumsbedingungen	61
4. 1. 2 Synthetische Phänotypen unter Stressbedingungen	62
4. 1. 2. 1 erhöhte Temperatur	62
4. 1. 2. 2 erhöhte Osmolarität	63
4. 1. 3 Membranintegrität der Deletionsmutanten	64
4. 1. 3. 1 Sensitivität gegenüber Detergenzien	64
4. 1. 3. 2 Nachweis von cytoplasmatischer β -Galaktosidase	66
4. 1. 4 Morphologische Charakterisierung aller Deletionsstämme	69
4. 2 globale Charakterisierung synthetischer Phänotypen	70
4. 2. 1 Phenotype Microarrays TM	71
4. 2. 2 Quantifizierung von Faltungsstress	79
4. 2. 2. 1 σ^F -Antwort in Deletionsmutanten	80
4. 2. 2. 2 Cpx- und Bae-Antwort in Deletionsmutanten	83
4. 3 Zellhüllproteine von Deletionsmutanten	86
4. 3. 1 Proteinkonzentration von Zellhüllproteinen	86
4. 3. 1. 1 FhuA	87
4. 3. 1. 2 OmpW	89
4. 3. 2 Faltungsintermediate des Außenmembranproteins LamB	91
4. 3. 2. 1 DegP-Doppelmutanten	92

4. 3. 2. 2 <i>SurA-Doppelmutanten</i>	93
4. 4 Komplementationsassays Protease-defizienter Mutanten	94
4. 5 Redundante Funktionen von DegP und Tsp	96
4. 5. 1 Reinigung von Tsp	97
4. 5. 2 Proteolyse von β -Casein und RseA durch die Serinproteasen DegP und Tsp	98
4. 5. 3 Tsp-Aktivitätstest mit dem DegP-Substrat DPMFKLV-pNA	99
4. 5. 4 Die Sequenzspezifität der PDZ-Domänen von DegP und Tsp	100
5 DISKUSSION	101
5. 1 Redundante Faktoren der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle	101
5. 1. 1 Die Proteinqualitätskontrolle ist als flexibles Netzwerke organisiert	102
5. 1. 2 Die Redundanz der Faltungsfaktoren ist abhängig von Umgebungsbedingungen	104
5. 2 SurA, DegP, Tsp und DsbA sind Schlüsselemente der Proteinqualitätskontrolle	106
5. 3 Substrate der Proteinqualitätskontrolle	110
5. 4 Chaperonaktivität von DegP, Tsp und YfgC	114
5. 5 Potentielles Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle im Periplasma	114
5. 6 DegP und Tsp haben <i>in vitro</i> redundante Funktionen	116
5. 6. 1 DegP und Tsp haben gemeinsame Substrate	116
5. 6. 2 Die PDZ-Domänen von DegP und Tsp haben ähnliche Bindungspartner	117
5. 7 Ausblick	118
6 ZUSAMMENFASSUNG	120
7 LITERATUR	122
8 ANHANG	133
DANKSAGUNG	143
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	144

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. 1: Schematischer Aufbau der Zellhülle von <i>E. coli</i>	14
Abb. 1. 2: Sekretionsprozess durch das SecYEG-Translocon	16
Abb. 1. 3: Schematische Darstellung von Skp	19
Abb. 1. 4: Kristallstruktur von SurA	22
Abb. 1. 5: Disulfidbrückenbildung im Periplasma von <i>E. coli</i>	24
Abb. 1. 6: Kristallstruktur von DegP als 24mer	27
Abb. 1. 7: Kristallstruktur von PtrA	29
Abb. 1. 8: Stressantwort im Periplasma von <i>E. coli</i>	31
Abb. 3. 1: <i>Primer</i> -Design bei Deletionsstämmen der Keio-Kollektion	47
Abb. 4. 1: Wachstum des Deletionstammes <i>surA dsbA</i> bei 43°C	62
Abb. 4. 2: Spezifische β -Galaktosidase-Aktivität von <i>dsbA</i> -Doppelmutanten	67
Abb. 4. 3: Spezifische β -Galaktosidase-Aktivität von <i>degP</i> -Doppelmutanten	68
Abb. 4. 4: Spezifische β -Galaktosidase-Aktivität von <i>tsp</i> -Doppelmutanten	69
Abb. 4. 5: Kolonienmorphologie von Doppel-KO-Stämmen	70
Abb. 4. 6: Aufteilung der PM-Abbildungen	71
Abb. 4. 7: PMs der Deletionsstämme a) <i>degP</i> , b) <i>dsbA</i> , c) <i>degP dsbA</i>	72
Abb. 4. 8: PMs der Deletionsstämme a) <i>degP</i> , b) <i>tsp</i> , c) <i>degP tsp</i>	73
Abb. 4. 9: PMs der Deletionsstämme a) <i>surA</i> , b) <i>ptrA</i> , c) <i>surA ptrA</i>	74
Abb. 4. 10: PMs der Deletionsstämme a) <i>surA</i> , b) <i>yfgC</i> , c) <i>surA yfgC</i>	75
Abb. 4. 11: PMs der Deletionsstämme a) <i>surA</i> , b) <i>dsbA</i> , c) <i>surA dsbA</i>	76
Abb. 4. 12: Relative <i>rpoE</i> Expression in <i>dsbA</i> -Doppelmutanten	80
Abb. 4.13: Relative <i>rpoE</i> Expression in <i>degP</i> -Doppelmutanten	81
Abb. 4. 14: Relative <i>rpoE</i> Expression in <i>tsp</i> -Doppelmutanten	82
Abb. 4. 15: Relative <i>spy</i> Expression in <i>dsbA</i> -Doppelmutanten	83
Abb. 4. 16: Relative <i>spy</i> Expression in <i>degP</i> -Doppelmutanten	84
Abb. 4. 17: Relative <i>spy</i> Expression in <i>tsp</i> -Doppelmutanten	85
Abb. 4. 18: FhuA Konzentration in Deletionsstämmen	87
Abb. 4. 19: Relative <i>fhuA</i> Expression in verschiedenen Deletionsstämmen	88
Abb. 4. 20: OmpW Konzentration in Deletionsstämmen	89
Abb. 4. 21: Relative <i>ompW</i> Expression in verschiedenen Deletionsstämmen	90

Abb. 4. 22: Faltungsintermediate von LamB	91
Abb. 4. 23: LamB-Faltungsintermediate in <i>degP</i> -Doppelmutanten	92
Abb. 4. 24: LamB Expression in <i>degP</i> -Doppelmutanten	93
Abb. 4. 25: LamB-Faltungsintermediate in <i>surA</i> -Doppelmutanten	93
Abb. 4. 26: LamB Expression in <i>surA</i> -Deletionsstämmen	94
Abb. 4. 27: Reinigung von Tsp-SA	97
Abb. 4. 28: Proteolyse von β -Casein und RseA durch die Serinproteasen DegP und Tsp	98
Abb. 4. 29: Aktivitätstest von DegP und Tsp mit dem Substrat DPMFKLV-pNA	99
Abb. 4. 30: Profil der PDZ-Bindungsspezifität von Tsp und DegP	100
Abb. 5. 1: Synthetisch letale Phänotypen unter optimalen Wachstumsbedingungen	102
Abb. 5. 2: Synthetisch letale Phänotypen	103
Abb. 5. 3: Synthetische Phänotypen	105
Abb. 5. 4: Potentieller Faltungsweg von a) LamB und b) FhuA	115
Abb. 8. 1: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 1 und 2	133
Abb. 8. 2: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 3 und 4	134
Abb. 8. 3: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 5 und 6	135
Abb. 8. 4: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 7 und 8	136
Abb. 8. 5: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 9 und 10	137
Abb. 8. 6: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 11 und 12	138
Abb. 8. 7: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 13 und 14	139
Abb. 8. 8: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 15 und 16	140
Abb. 8. 9: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 17 und 18	141
Abb. 8. 10: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 19 und 20	142

Tabellenverzeichnis

Tab. 3. 1: Verwendete Antibiotika	36
Tab. 3. 2: Verwendete Bakterienstämme	36
Tab. 3. 3: Deletionsstämme, im Rahmen dieser Arbeit hergestellt	38
Tab. 3. 4: Verwendete Vektoren und Plasmide	40
Tab. 3. 5: Verwendete Oligonukleotide	41
Tab. 3. 6: Verwendete Primärantikörper	42
Tab. 3. 7: Verwendete Sekundärantikörper	42
Tab. 3. 8: Verwendete Proteine und Enzyme	43
Tab. 3. 9: Verwendete Protein- und Nukleinsäurestandards	43
Tab. 3. 10: Verwendete Komplettsysteme	43
Tab. 4. 1: Periplasmatische Faltungsfaktoren	61
Tab. 4. 2: Wachstum von Deletionsstämme unter hyperosmolaren Bedingungen	63
Tab. 4. 3: Wachstum von Deletionsstämmen auf NZA-Medium, versetzt mit 0,5 mM EDTA und 0,5% SDS	65
Tab. 4. 4: Kurzdarstellung weiterer PM-Tests	78
Tab. 4. 5: Wachstum komplementierter Deletionsstämme unter Stressbedingungen	95
Tab. 5. 1: Periplasmatische Faltungsfaktoren	102

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
α	Alpha
A. dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosindtriphosphat
β	Beta
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp, kb	Basenpaare, Kilo-Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Chloramphenicol; Zentimeter
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Δ	Delta; Differenz
Da, kDa	Dalton, Kilo-Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>

G	Guanin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
His	Histidin
HRP	Merrettich-Peroxidase
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
k	Kilo (10^3)
kb	Kilobasen
kan	Kanamycin
l	Liter
KO	<i>knockout</i>
Lac	Lactose
μ	Mikro (10^{-6})
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
min	Minute
n	Nano (10^{-9})
NBT	Nitroblautetrazolium
Ni-TED	Nickel-Tris-Carboxymethylethylendiamin
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus
NZA	NZ-Amin
OD	optische Dichte
OMP	Außenmembranprotein
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol

PM	<i>phenotype microarray</i> TM
pNA	p-Nitroanilin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> -PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
σ	Sigma
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T _M	Schmelztemperatur
U	Unit
üN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
W	Watt
3D	dreidimensional

Aminosäuren

Aminosäuren werden entsprechend der IUPAC-Nomenklatur im Ein- oder Dreibuchstaben-code angegeben.

1 Einleitung

1. 1 Bedeutung der Proteinqualitätskontrolle

Seit 1982 erstmals humanes Insulin aus dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) gewonnen wurde, nimmt die Zahl der rekombinant produzierten Proteintherapeutika ständig zu. So wurde in den letzten Jahren eine Reihe von Biopharmazeutika z. B. zur Behandlung von Multipler Sklerose und Hepatitis zugelassen, die aus *E. coli* gereinigt werden.

Mit der Entwicklung von weltweit ca. 400 neuen, biotechnologisch hergestellten Medikamenten („Auf einen Blick – Biotechnologie 2009“, VCI) steigt auch der Bedarf an optimierten Produktionsverfahren. Ein grundlegendes Verständnis allgemeiner Mechanismen der Proteinfaltung, -reparatur und -degradation, welche für die Funktionalität der rekombinanten Proteine essentiell sind, ist daher unabdingbar.

Die Prozesse der Proteinqualitätskontrolle sind jedoch nicht nur für biotechnologische Verfahren von Bedeutung, auch für die Medizin sind sie von großem Interesse. In den vergangenen Jahren wurde sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin ein Anstieg an multiresistenten pathogenen Bakterien beobachtet. In Deutschland ist allein die Rate der Fluorchinolon-resistenten *E. coli*-Stämme von 8 % in 2000 auf 30 % in 2007 angestiegen, wie Daten aus der Routinediagnostik belegen (EARSS Annual Report 2007). Die Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten wird daher zunehmend erschwert und die Entwicklung moderner Antibiotika dementsprechend immer wichtiger. Potentielle Angriffspunkte für neue Medikamente und Vakzinen bieten die Prozesse der bakteriellen Proteinfaltung, detaillierte Kenntnisse der Proteinqualitätskontrolle sind also auch hier erforderlich.

Neues Grundlagenwissen kann zudem auch für eukaryotische Systeme wichtig sein. Ist das Gleichgewicht von Proteinfaltung und Degradation in humanen Zellen gestört, kommt es beim Menschen zu schwerwiegenden Erkrankungen. Mittlerweile ist eine große Anzahl von Krankheiten bekannt, die mit der Fehlfaltung von Proteinen assoziiert sind, wie z. B. Mukoviszidose, Diabetes mellitus, Krebs, sowie die Alzheimersche- und Parkinson-Krankheit (Hebert & Molinari, 2007).

1. 2 Die Zellhülle von *E. coli*

Als Modell zur Untersuchung von Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle bietet sich die Zellhülle von *E. coli* an. Sie repräsentiert ein geeignetes System zur Beantwortung grundlegender Fragen, da die meisten zellulären Faktoren, die in Faltungsprozesse involviert sind, nicht essentiell und ATP-unabhängig sind. Experimentelle Ansätze werden dadurch stark vereinfacht.

Die Zellhülle von *E. coli*, durch die Innenmembran vom Cytoplasma abgegrenzt, umfasst das Periplasma und die Außenmembran (siehe Abb. 1. 1). Die Außenmembran ist, im Gegensatz zur Innenmembran, asymmetrisch. Sie ist aus einer inneren Phospholipid- und einer äußeren Lipopolysaccharidschicht aufgebaut. Die amphipatischen Lipopolysaccharide (LPS) bestehen aus drei Komponenten: (1.) Der hydrophobe Teil, das Lipid A, enthält gesättigte Fettsäuren, die an ein Glucosamin-Dimer gebunden sind. (2.) Der hydrophile Kopf des LPS-Moleküls besteht aus einem Oligosaccharid, der sogenannten zentralen Kern-Region und (3.) dem O-Antigen, einem Polymer aus sich wiederholenden Einheiten von Zuckerresten.

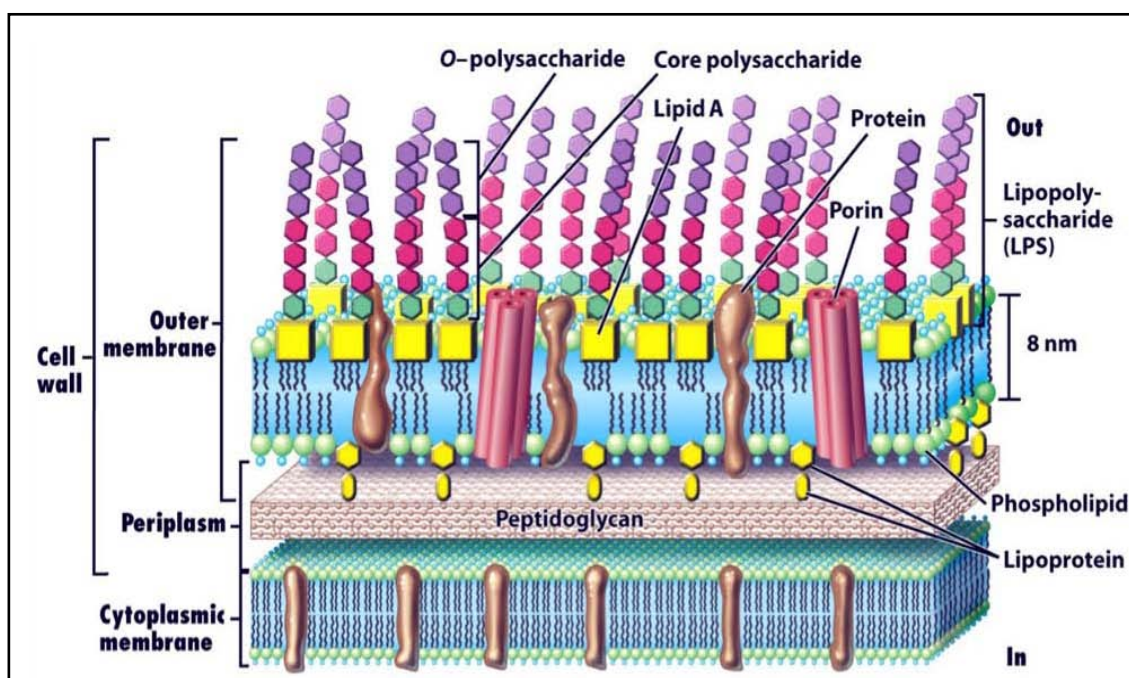


Abb. 1. 1: Schematischer Aufbau der Zellhülle von *E. coli* (aus Brock Biology of Microorganisms, Pearson Prentice Hall, Inc., 2006)

Zusätzlich zu Lipoproteinen enthält die Außenmembran eine Reihe von Proteinen, welche sich in ihrem typischen Aufbau von Innenmembranproteinen deutlich unterscheiden.

Innenmembranproteine durchspannen die Membran in Form von hydrophoben α -Helices, wohingegen Außenmembranproteine (OMPs) aus antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut sind, die zylindrische β -Fässer mit hydrophilem Kern bilden (Koebnik, 2000). Die Funktionen der OMPs sind vielfältig. Einige Außenmembranproteine sind Proteasen, Lipasen und Adhäsinen oder bilden Effluxkanäle und Siderophor-Transporter. Hauptsächlich handelt es sich jedoch um Porine, welche die passive Diffusion von Nährstoffen ermöglichen (Mogensen & Otzen, 2005).

Die Außenmembran fungiert als selektive Abgrenzung zur Umwelt und bewahrt das Bakterium vor schädlichen Einflüssen, für die Stabilität der Zelle ist das Periplasma verantwortlich. Ein Stützskelett aus Murein ist in den gelartigen periplasmatischen Raum eingebettet und schützt das Bakterium besonders unter osmotischen Stressbedingungen, welche in der natürlichen Umgebung von *E. coli* oftmals herrschen. Heteropolymere Ketten aus β -1,4-glycosidisch verknüpften N-Acetylglucosamin- und N-Acetylmuraminsäuremolekülen bilden das Grundgerüst der Mureinschicht. Zusätzliche Stabilität erlangt das Makromolekül durch die Quervernetzung der Ketten über Tetrapeptide an der Muraminsäure.

Neben der Mureinschicht sind in diesem Kompartiment ungefähr 150 Proteine zu finden. Dazu gehören Substrat-bindende Proteinen ebenso wie Enzyme, die in metabolische Prozesse, Virulenz und Motilität involviert sind, aber auch Proteine der Mureinbiogenese und der Zellteilung (Ehrmann, 2005). Zusätzlich findet man Chaperone, Prolinisomerasen, Oxidoreduktasen und Proteasen, die für die Biogenese von Außenmembranproteinen wichtig sind.

1. 3 Biogenese von Außenmembranproteinen

1. 3. 1 SecYEG-Translocon

Ebenso wie periplasmatische Proteine werden integrale Außenmembranproteine im Cytoplasma synthetisiert und müssen anschließend die Innenmembran passieren, um ihren endgültigen Bestimmungsort zu erreichen. Es gibt zwei mögliche Translokationswege, das Sec-System für den Transport ungefalteter Proteine (de Keyzer, 2003) oder das Twin-Arginin-Transportsystem (TAT), welches bereits gefaltete Proteine befördert (Lee, 2006). Der TAT-

Weg besitzt nur ungefähr 30 Substrate, wohingegen geschätzte 420 Proteine (ECCE Database), darunter alle Außenmembranproteine, das SecYEG-Translocon nutzen.

Alle Proteine, die über das Sec-Translocon die Innenmembran passieren, besitzen eine spezielle N-terminale Sequenz, entweder in Form eines Transmembransegments oder als Signalsequenz, die nach der Translokation im Periplasma abgespalten wird. Die Signalsequenz besteht aus einem kurzen, positiv geladenen N-terminalen Segment, einem längeren hydrophoben Abschnitt und einer kurzen C-terminalen Domäne, welche die Peptidaseschnittstelle beinhaltet (Pugsley, 1993).

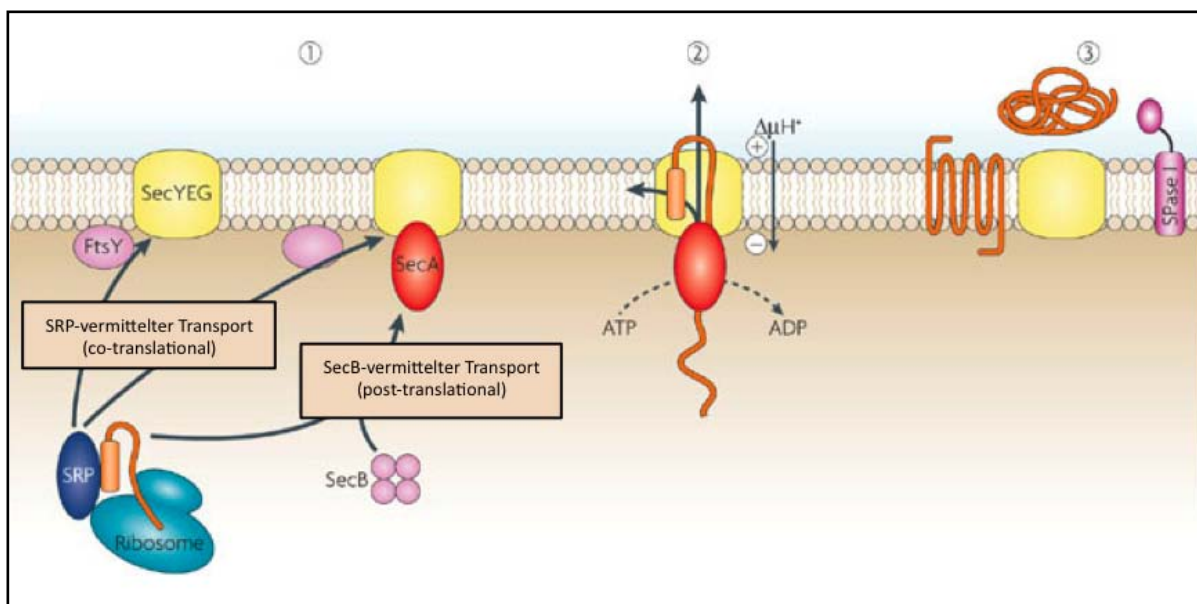


Abb. 1. 2: Sekretionsprozess durch das SecYEG-Translocon (nach Papanikou, 2007)

1. Sekretorische Präproteine werden mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert und gelangen entweder über den SRP- oder den SecB-vermittelten Transport zur Innenmembran. FtsY und SecA dienen als Rezeptoren für SRP bzw. SecB. 2. Die Präproteine translozieren durch den SecYEG-Kanal. Die Energie für diesen Prozess stammt aus der Bindung und Hydrolyse von ATP durch SecA und die protonenmotorische Kraft ($\Delta\mu\text{H}^+$). 3. Die Proteine integrieren in die Membran oder gelangen ins Periplasma nachdem die Signalsequenz von der Signalpeptidase SPase I abgespalten wurde.

Der Transport ungefalteter Protein zum SecYEG-Translocon verläuft entweder post- oder cotranslational. Der cotranslationale Mechanismus, der über das SRP (*signal recognition particle*)-System gesteuert wird, spielt hauptsächlich bei der Biogenese von Innenmembranproteinen eine Rolle (Koch, 2003). Alle bisher untersuchten OMPs und periplasmatischen Proteine werden posttranslational zum Sec-Kanal transportiert (de Keyzer, 2003). Auf ihrem Weg durch das Cytosol interagieren diese Proteine mit Chaperonen wie SecB, um ihren ungefalteten, translokations-kompetenten Zustand aufrecht

zu erhalten. Außerdem sorgt die Interaktion von SecB mit der membranständigen ATPase SecA für die zielgerichtete Lokalisation des Vorläuferproteins an das SecYEG-Translocon. Die Bindung der Präproteine an SecB ist allerdings nicht essentiell für die Translokation, doch sie erhöht die Sekretionseffizienz etlicher gut untersuchter Außenmembranproteine (Baars, 2006).

Die eigentliche Translokation des Vorläuferproteins durch den heterotrimeren Membrankomplex SecYEG wird schließlich durch die Interaktion mit der Signalsequenz und die Bindung von ATP durch SecA initiiert. Die Hydrolyse von ATP durch SecA führt dazu, dass ein Teil des Präprotein in den SecYEG-Kanal entlassen wird. Daraufhin kann SecA das Vorläuferprotein und ATP erneut binden und treibt so die schrittweise Translokation des Vorläuferproteins durch die Innenmembran voran (Economou, 1994). ATP ist zwar die Hauptenergiequelle für diesen Vorgang, aber auch die protonenmotorische Kraft kann über einen bisher unbekannten Mechanismus den Proteintransport über die Innenmembran vermitteln (Driessen, 2008).

1. 3. 2 BAM-Komplex

Nachdem das reife Polypeptid ins Periplasma entlassen wurde, wird es durch die Bindung an Chaperone wie Skp (siehe 1. 4. 1), SurA (siehe 1. 4. 2) und DegP (siehe 1. 4. 4) vor Fehlfaltung und Aggregation geschützt, bis es durch den BAM-Komplex in die Außenmembran integriert (Sklar, 2007a).

Coimmunopräzipitationsexperimente konnten zeigen, dass der BAM-Komplex aus BamA (YaeT) und den vier Lipoproteinen BamB (YfgL), BamC (YfiO), BamD (NlpB) und BamE (SmpA) zusammengesetzt ist (Sklar, 2007b). BamA besteht aus einem C-terminalen membranintegrierten β -Fass und einer N-terminalen periplasmatischen Verlängerung aus fünf POTRA (*polypeptide transport-associated*)-Domänen. Faltungsintermediate der Außenmembranproteine binden vermutlich über ein C-terminales Motiv an diese Domänen und lösen damit eine Konformationsänderung in BamA aus (Robert, 2006). Möglicherweise erlaubt diese Konformationsänderung dem gebundenen Protein in die Außenmembran zu integrieren. Ein exakter Mechanismus für diesen Vorgang ist bisher jedoch nicht beschrieben (Bos, 2007).

Weitere wichtige Einblicke in den Prozess der Membranintegration lieferten Versuche mit

dem Maltoseporin LamB. Wie die meisten Außenmembranproteine liegt auch LamB in seiner funktionellen Form als Trimer vor, jedoch wurden in *E. coli*-Außenmembranfraktionen zusätzlich gefaltete Monomere nachgewiesen (Misra, 1991). Weitere *pulse-chase*-Experimente mit Faltungsintermediaten von LamB zeigten, dass die Umwandlung von ungefalteten in gefaltete LamB-Monomere in *surA*- und *bamB*-Mutanten gleichermaßen eingeschränkt ist (Ureta, 2007). Diese Daten deuten daraufhin, dass Chaperone wie SurA die Polypeptide nicht nur schützen, sondern sie auf ihre Membranintegration vorbereiten und zum BAM-Komplex transportieren, wo sie als Monomere eingebaut werden und schließlich zu Trimeren oligomerisieren.

Neben SurA, Skp und DegP gibt es weitere periplasmatische Chaperone und Enzyme, die die Biogenese von Außenmembranproteinen unterstützen. Sie wurden in den letzten Jahren durch zahlreiche Studien identifiziert und sollen im Folgenden näher vorgestellt werden.

1. 4 Faltungsfaktoren im Periplasma

Die Proteinfaltung ist ein spontaner Prozess, bei dem, neben kovalenten Interaktionen, hydrophobe Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrücken die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins bedingen. Damit die Proteinfaltung im Periplasma trotz der hohen Proteingeesamtkonzentration von bis zu 150 mg/ml geordnet ablaufen kann, interagieren die Polypeptide mit speziellen Faktoren, den Chaperonen (siehe 1. 4. 1). Kovalente Modifikationen (Prolinisomerisierung und Disulfidbrückenbildung) während der Proteinfaltung sind aufgrund ihrer langen Reaktionszeiten die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte des Prozesses und werden durch spezielle Enzyme (siehe 1. 4. 2 und 1. 4. 3) katalysiert, um den vorzeitigen Abbau des ungefalteten Proteins durch Proteasen (siehe 1. 4. 4) zu verhindern.

1. 4. 1 Molekulare Chaperone

Molekulare Chaperone sind per Definition zelluläre Faktoren, die neu synthetisierte Proteine vor Fehlfaltung, Aggregation und Degradation schützen und somit die korrekte Faltung der gebundenen Proteine unterstützen. Im Gegensatz zu den gut untersuchten Chaperonen des Cytosols, wie z. B. GroEL/ES und DnaK/DnaJ (Fink, 1999), sind periplasmatische Chaperone

kaum charakterisiert. Das einzig bekannte Protein, welches im Periplasma ausschließlich als generelles Chaperon fungiert, ist Skp.

Skp

Die trimere Struktur von Skp (*Seventeen Kilodalton Protein*) besteht aus einem zentralen β -Fass, welches aus jeweils vier β -Strängen der Untereinheiten aufgebaut ist (Walton & Sousa, 2004). Zusammen mit den C-terminalen α -Helices der drei Monomere formt das β -Fass einen zentralen Hohlraum, in dem Substrate über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen gebunden werden können (Qu, 2007).

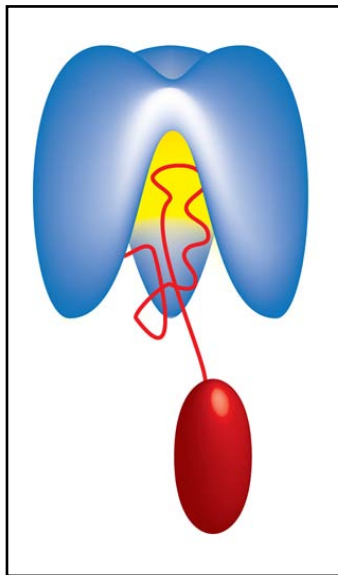


Abb. 1. 3: Schematische Darstellung von Skp (Sawa, 2010). Das Chaperon Skp ist in blau und das gebundene Substrat (OmpA) ist in rot dargestellt. Hydrophobe Interaktionen sind gelb gekennzeichnet.

Der zentrale Hohlraum scheint jedoch zu klein, um Außenmembranproteine wie OmpA in einer vollständig ungefalteten Form aufnehmen zu können (siehe Abb. 1. 3). Tatsächlich zeigten NMR-Studien mit Skp-OmpA-Komplexen, dass die Membran-Domäne von OmpA ungefaltet im zentralen Hohlraum von Skp gebunden ist, wohingegen die periplasmatische Domäne in ihrer nativen Form daraus hervorragt (Walton, 2009).

Membranassoziiertes Skp bindet seine Substrate noch bevor sie vollständig vom Sec-Translocon ins Periplasma entlassen werden (Schäfer, 1999; Harms, 2001). Der Skp-OMP-Komplex wird

freigesetzt und gelangt schließlich zur Außenmembran. Bevor das Protein jedoch in die Membran integrieren und seine endgültige Konformation einnehmen kann, ist die Bindung von LPS an Skp erforderlich. *In-vitro*-Experimente zeigten, dass das Außenmembranprotein OmpA sowohl Skp als auch LPS für die effiziente

Integration in Lipidvesikel benötigt (Bulieris, 2003). Ob LPS *in vivo* die Substratfaltung nur unterstützt oder membranständiges LPS zusätzlich als eine Art Zielmarkierung dient, ist bisher nicht geklärt (Walton & Sousa, 2004).

Der Skp-LPS-assoziierte Faltungsmechanismus ist jedoch nicht der einzige Weg für Außenmembranproteine durch das Periplasma. Weitere wichtige Komponenten sind in diesem Zusammenhang die Prolinisomerasen.

1. 4. 2 Prolinisomerasen

Die Verknüpfung zweier Aminosäuren über eine Peptidbindung besitzt partiellen Doppelbindungscharakter. Daraus resultiert die planare Anordnung der Peptidbindung und ein mögliches Vorliegen in *cis*- oder *trans*-Konformation. Während in nicht prolinhaltigen Peptidbindungen das *trans*-Konformer energetisch bevorzugt ist, sind in Peptidyl-Prolyl-Bindungen beide Konformere von vergleichbarer thermodynamischer Stabilität (Stein, 1993). Die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolylbindungen ist für die korrekte Faltung bestimmter Proteine essentiell (Göthel & Marahiel, 1999). Aufgrund einer hohen Rotationsbarriere von ungefähr 20 kcal/mol (Schmid & Baldwin, 1978) ist diese Reaktion allerdings ein relativ langsamer Prozess, der von spezifischen Isomerasen katalysiert werden muss, um den vorzeitigen Abbau unvollständig gefalteter Proteine zu verhindern.

Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen) sind ubiquitär, man findet sie in verschiedenen Zellkompartimenten von Pro- und Eukaryoten. Sie werden anhand ihrer spezifischen Inhibitoren in drei Familien (Cyclophiline, FK506-bindenden Proteine und Parvuline) unterteilt. Die Cyclophiline werden durch Cyclosporin A und die FK506-bindenden Proteine (FKBP) durch FK506 inhibiert, beides Immunsuppressiva, die bei der Organtransplantation eingesetzt werden. Der Familie der Parvuline werden PPIasen zugeordnet, die eine ausgeprägte Sequenzhomologie zu PpiC aus *E. coli* aufweisen und weder durch FK506 noch durch Cyclosporin A gehemmt werden (Rahfeld, 1994). Im Periplasma von *E. coli* finden sich Vertreter aller drei Familien: PpiA gehört zu den Cyclophilinen, FkpA zur FKBP-Familie, SurA und PpiD sind Parvuline.

PpiA

Aufgrund seiner Sequenzhomologie zu humanen Cyclophilinen wurde PpiA als erste Prolinisomerase aus *E. coli* kloniert und biochemisch charakterisiert. Vergleicht man jedoch humane Cyclophiline mit dem *E. coli*-Protein, ergeben sich strukturelle Abweichungen in vier Regionen (Clubb, 1994). Diese Unterschiede könnten die geringfügige Inhibierung von PpiA durch Cyclosporin A erklären. Ob diese Regionen auch für die Substratspezifität der Isomerase verantwortlich sind, kann nur vermutet werden, da bisher keine nativen Substrate von PpiA bekannt sind. Außerdem hat die Deletion von *ppiA* keine Auswirkung auf die Menge korrekt gefalteter Proteine in Periplasma oder Außenmembran (Kleerebezem, 1995;

Justice 2005). Der derzeit einzige Hinweis, dass PpiA eine Bedeutung in allgemeinen Faltungsreaktionen zukommt, ist die Regulation der *ppiA*-Expression durch den stress-induzierten Cpx-Signalweg (Pogliano, 1997) (siehe 1. 5. 1).

FkpA

Wie PpiA wurde auch das dimere FkpA aufgrund seiner Sequenzhomologie als Prolinisomerase identifiziert. FkpA besteht aus zwei Domänen, die über eine lange α -Helix miteinander verbunden sind. Die C-terminale Domäne bindet FK506, FkpA gehört daher zur FKBP-Familie von PPIasen (Horne & Young, 1995). Über die N-terminale Domäne sind die Untereinheiten des Dimers miteinander verbunden. Exprimiert man die beiden Domänen getrennt voneinander, kann man ihnen weitere Funktionen zuordnen. Die C-terminale Domäne liegt als Monomer mit PPIase-Aktivität vor (Arié, 2001), die N-terminale Domäne existiert als Mischung aus Monomer und Dimer und zeigt Chaperonaktivität (Saul, 2004).

Die Rolle von FkpA als Chaperon wurde erstmals durch Untersuchungen an Deletionsstämmen deutlich. *FkpA*-Nullmutanten von *E. coli* zeigen zwar keinen offensichtlichen Phänotyp, die σ^E -abhängige Stressantwort (siehe 1. 5. 2) ist in diesen Bakterien jedoch aktiviert. Zudem verhindert die Überexpression von FkpA die Entstehung von periplasmatischen *inclusion bodies* aus MalE31, einer fehlgefalteten Variante des Maltose-Bindeproteins. Auch eine FkpA-Mutante ohne PPIase-Aktivität ist in der Lage die Aggregation von MalE31 zu verhindern (Arié, 2001). Die katalytische Domäne scheint daher für die Chaperonaktivität nicht essentiell zu sein.

Die genaue Rolle von FkpA *in vivo* bleibt ungeklärt, denn aufgrund der transienten Interaktionen von FkpA mit Faltungsintermediaten konnten bisher weder *in vitro* noch *in vivo* stabile Komplexe des Faltungsfaktors mit Substraten gefunden werden. Die Entdeckung, dass das *E. coli*-Toxin Colicin M auf *fkpA*-Mutanten nicht schädlich wirkt, deutete erstmals auf ein natives FkpA-Substrat hin. Bestätigt wurde diese These durch Rückfaltungsexperimente mit dem Prolin-reichen Colicin, die zeigten, dass FkpA die Faltung des Proteins unterstützt. Von *fkpA*-Deletionsmutanten produziertes Colicin M ist jedoch *in vivo* und *in vitro* aktiv. Da Colicin M seine Konformation ändert, wenn es von einer Zelle aufgenommen wird, ist FkpA möglicherweise notwendig, um die aktive Form des Toxins im Periplasma wiederherzustellen (Hullmann, 2008).

SurA

Tormo *et al.* untersuchten vor fast 20 Jahren das Wachstum von *E. coli* in Minimalmedium. Dabei isolierten sie die Mutation *surA* (*sur* = *survival*), die für das Überleben der Bakterien in der stationären Phase essentiell schien (Tormo, 1990). Mittlerweile konnte man *surA*-Mutanten zahlreiche Eigenschaften zuordnen, welche eine grundlegende Rolle von SurA in der OMP-Biogenese nahelegen. Die Hypersensitivität von *surA*-Deletionsstämmen gegenüber toxischen Stoffen, wie z. B. Detergenzien und hydrophoben Antibiotika, kann als Hinweis auf schwerwiegende Membrandefekte gewertet werden. Tatsächlich ist die Proteinmenge in der Außenmembran von *surA*-Mutanten im Gegensatz zu *skp*-Mutanten verringert (Sklar *et al.*, 2007a). Zudem konnte gezeigt werden, dass SurA bei der Faltung der Außenmembranproteine OmpA, OmpF, OmpC, LamB (Lazar, 1996; Rouviere 1996), LptD und FhuA (Vertommen, 2009) mitwirkt.

Das Parvulin SurA besteht aus einer N-terminalen, zwei PPlase- und einer C-terminalen Domäne. Die PPlase-Aktivität beschränkt sich ausschließlich auf die P2-Domäne, P1 ist katalytisch inaktiv. Deletiert man die Parvulin-Domänen P1 und P2, verhindert SurA dennoch

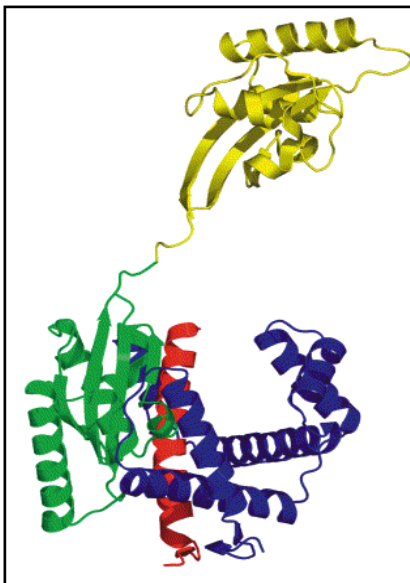


Abb. 1. 4: Kristallstruktur von SurA. Die N-terminale Domäne ist in blau, die C-terminale Domäne ist in rot und die Parvulin-domänen P1 und P2 sind in grün bzw. gelb dargestellt.

die Aggregation denaturierter Citratsynthase. Außerdem komplementiert SurA auch ohne PPlase-Aktivität die letalen Phänotypen der *skp surA* - und *ppiD surA* - Doppelmutanten (Behrens, 2001). Diese Daten legen nahe, dass SurA eine Chaperonaktivität in N- und C-Terminus besitzt, die für die Funktionalität von SurA weitaus bedeutender ist als ihre PPlase-Aktivität.

Die Kristallstruktur von SurA unterstreicht dieses Ergebnis, denn sie zeigt, dass die Chaperon- und die PPlase-Domäne tatsächlich aus distinkten strukturellen Einheiten bestehen (siehe Abb. 1. 4). Die N- und C-terminale Region bilden mit der inaktiven ersten Parvulin-domäne eine größere zentrale Einheit, die über 30 Å Entfernung mit der

kleineren Einheit der zweiten PPlase-Domäne verbunden ist. Die zentrale Domäne bildet eine tiefe, hydrophobe Spalte, welche eine Bindetasche für ungefaltete Substrate darstellen könnte (Bitto & McKay, 2002). Ob Substrate, die an der Chaperondomäne gebunden sind

auch durch die Prolinisomerase umgewandelt werden können, ist bisher nicht geklärt.

PpiD

Neben SurA gibt es ein weiteres Parvulin im Periplasma. Das monomere PpiD ist über ein N-terminales Transmembransegment in der Innenmembran verankert, seine katalytische C-terminale Parvulin-Domäne ragt in den periplasmatischen Raum. Die Interaktion von PpiD mit translozierenden Proteinen, welche durch die Lokalisation der Prolinisomerase ermöglicht wird, begünstigt die Freisetzung der neu synthetisierten Proteine vom SecYEG-Translocon (Antonoaea, 2008).

Abgesehen von homologen Strukturen haben PpiD und SurA noch weitere Gemeinsamkeiten. So sind *ppiD*-Deletionsstämme ebenfalls hypersensitiv gegenüber SDS und diversen Antibiotika und sie besitzen verringerte Mengen der Außenmembranproteine OmpA, OmpF, OmpC und LamB. Neben diesen Ähnlichkeiten führt die Tatsache, dass PpiD erstmals als *multicopy suppressor* von *surA*-Mutanten beschrieben wurde (Dartigalongue & Raina, 1998), zu der Annahme, dass SurA und PpiD redundante Funktionen haben könnten. Diese These wird durch *in vitro* Daten gestützt. So konnte gezeigt werden, dass PpiD und SurA mit den aromatischen Resten des Modell-Peptids Δ -Somatostatin interagieren. Die Substratspezifität von PpiD scheint allerdings etwas breiter zu sein als die von SurA, da PpiD neben aromatischen Resten auch hydrophobe Aminosäuren in Modellpeptiden binden kann (Stymest & Klappa, 2008).

1. 4. 3 Oxidoreduktasen

Neben der Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen gibt es einen weiteren wichtigen Schritt im Faltungsweg von Proteinen, der von speziellen Enzymen katalysiert werden muss: die Einführung von Disulfidbrücken. Disulfidbrücken tragen einen wichtigen Teil zur dreidimensionalen Struktur von Proteinen bei. Sie erhöhen nicht nur die Stabilität des Polypeptids, sondern sind oftmals für die vollständige Funktionalität des Proteins unabdingbar.

In vielen Organismen werden Disulfidbrücken in speziellen Kompartimenten gebildet. Die Proteindisulfidisomerase PDI findet man im eukaryotischen endoplasmatischen Reticulum, in *E. coli* sind die Dsb (*disulfide bond forming*)-Proteine in Innenmembran und Periplasma

lokalisiert. Proteine, die Disulfidbrücken für ihre korrekte Faltung benötigen, müssen daher aus den reduzierenden Bedingungen des Cytoplasmas in die oxidierende Umgebung des Periplasmas transloziert werden.

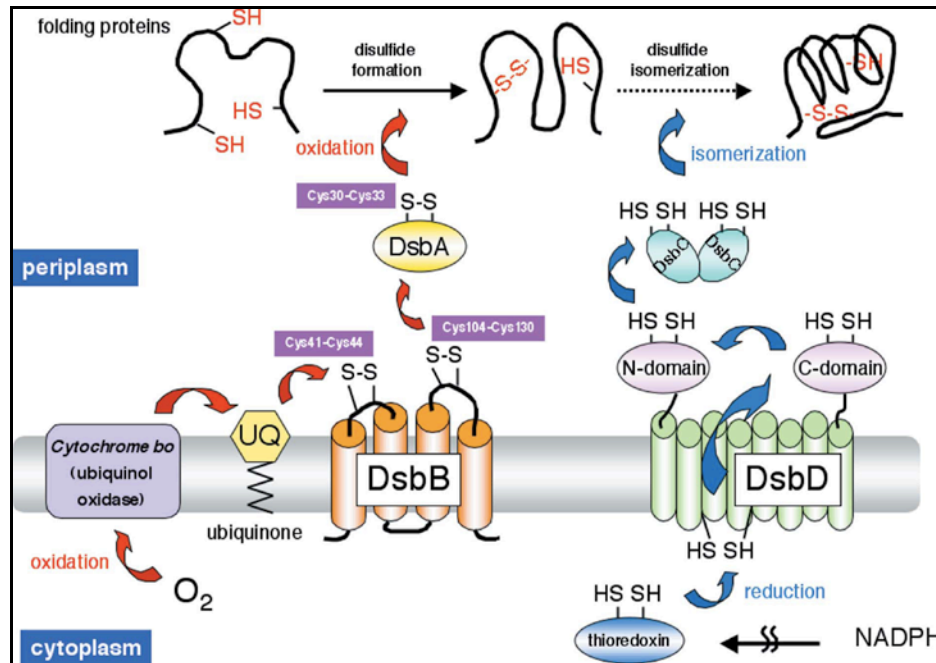


Abb. 1. 5: Disulfidbrückenbildung im Periplasma von *E. coli* (Inaba, 2009)

Noch während des Transports der ungefalteten Polypeptide durch die SecYEG-Pore ins Periplasma interagiert DsbA mit den Cysteinen dieser Proteine (siehe Abb. 1. 5). Die Thiol-Gruppen von zwei Cysteinen werden dabei durch die Abspaltung zweier Wasserstoffatome kovalent verbunden. Das Innenmembranprotein DsbB sorgt anschließend dafür, dass DsbA für weitere Reaktionen wieder im oxidierten Zustand vorliegt, indem es Elektronen von DsbA auf Quinone der Innenmembran überträgt.

Benötigt das Substratprotein für seine native Struktur Disulfidbrücken aus konsekutiven, also aufeinanderfolgenden Cysteinen, kann DsbA allein zur Brückenbildung ausreichen. Handelt es sich aber um nicht-konsequente Cysteine oder erhöht sich das Redoxpotential des Periplasmas, kann es zur Fehlfaltung des Substrats kommen (Berkmen, 2005; Messens, 2007). Um die Degradation des nicht-nativen Proteins durch Proteasen zu verhindern, können die beiden Disulfidisomerasen DsbC und DsbG die falschen Disulfidbrücken korrigieren (Zapun, 1995; Bessette, 1999). Die beiden homologen Enzyme müssen für die Isomerisierungsreaktion in einer reduzierten Form vorliegen. Dafür sorgt DsbD, ein Innenmembranprotein, das den Elektronentransfer vom cytoplasmatischen Thioredoxin ins

Periplasma vermittelt (Katzen & Beckwith, 2000). DsbA und DsbC, zwei periplasmatische Vertreter der Dsb-Familie, sollen im Folgenden näher erläutert werden.

DsbA

DsbA ist ein monomeres 21 kDa großes, periplasmatisches Protein. Es gehört zur Familie der Thioredoxine und besitzt deren charakteristisches Cys-X-X-Cys-Motiv (Cys₃₀-Pro₃₁-His₃₂-Cys₃₃) im aktiven Zentrum (Martin, 1993). Im nativen Protein befindet sich über den Cysteinen dieser Thioredoxindomäne eine hydrophobe Stelle, die vermutlich der Substratbindung dient (Guddat, 1998). Unterhalb des aktiven Zentrums zeigt die Kristallstruktur von DsbA eine hydrophobe Spalte, in der periplasmatische Bereiche von DsbB binden können. Die für den Elektronentransport notwendige Interaktion der beiden Proteine wird auf diese Weise gewährleistet (Inaba, 2009).

DsbA besitzt mit -120 mV das zweithöchste Redoxpotenzial unter den Disulfidoxidoreduktasen (Wunderlich & Glockshuber, 1993; Grimshaw, 2008). Die Stärke des Oxidationsmittels ist vermutlich für die schnelle Katalyse von Substraten und die Aufrechterhaltung des oxidierenden Milieus im Periplasma verantwortlich (Grauschopf, 1995). Ausschlaggebend für das hohe Redoxpotenzial scheint das Thioredoxin-Motiv von DsbA zu sein, denn der Austausch der beiden Aminosäuren, die zwischen den Cysteinen des aktiven Zentrums liegen, führt zu einer Änderung des Potenzials (Mössner, 1998).

Das *dsbA*-Gen ist zusammen mit dem uncharakterisierten *rdoA* Teil eines Operons. Es wird unter normalen Bedingungen konstitutiv exprimiert, unter Stressbedingungen wird seine Expression vom Cpx-System hochreguliert (siehe Abschnitt 1. 5. 1) (Danese & Silhavy, 1997). In der Zellhülle von *E. coli* befinden sich über 300 Proteine, die mindestens zwei Cysteine besitzen und somit potentielle Substrate von DsbA sind (Hiniker & Bardwell, 2004). Zu den bereits identifizierten und gut untersuchten Substraten der Oxidoreduktase gehören u. a. das Außenmembranprotein OmpA und die periplasmatische Serinprotease DegP (siehe 1. 4. 4. 1).

DsbC

DsbC ist ein 25 kDa großes Protein, das als Homodimer im Periplasma vorliegt. Jedes Monomer besitzt vier Cysteine. Cystein 141 und Cystein 163 bilden eine Disulfidbrücke, die

für die Funktionalität des Enzyms essentiell ist (Liu & Wang, 2001). Die Cysteine 98 und 101 sind Teil des klassischen Thioredoxin-Sequenzmotivs und damit des aktiven Zentrums.

DsbC besitzt neben der Thioredoxin-Domäne noch eine N-terminale Dimerisierungsdomäne. Die Dimerisierung von DsbC führt zur Bildung einer hydrophoben Tasche, welche fehlgefaltete Proteine mit inkorrekten Disulfidbrücken möglicherweise erkennen und binden kann (Darby, 1998), die Isomerisierungsreaktion wird von beiden Monomeren jedoch unabhängig voneinander katalysiert (Arredondo, 2009).

Obwohl DsbA und DsbC im gleichen Kompartiment koexistieren und beide Enzyme eine Thioredoxindomäne besitzen, wird DsbC von DsbD in einem reduzierten Zustand gehalten und nicht durch DsbB oxidiert, denn sterisch ist eine Bindung des dimeren DsbC an DsbB unmöglich (Inaba, 2009).

Der Promotor von *dsbC* weist putative CpxR-Bindestellen auf, wie DsbA könnte DsbC vom Cpx-System reguliert werden. Die Transkription von *dsbC* unterliegt jedoch auch der Kontrolle des σ^E -abhängigen Signalwegs (Dartigalongue, 2001).

1. 4. 4 Proteasen

Kommt es trotz der Anwesenheit von Faltungshelfern wie Chaperonen, Prolinisomerasen und Oxidoreduktasen zur Fehlfaltung und Aggregation von Polypeptiden, können Proteasen diese Proteine abbauen und somit die Lebensfähigkeit der Zelle sicherstellen.

Proteasen katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen und werden in der MEROPS-Datenbank (<http://merops.sanger.ac.uk/>) anhand ihrer katalytischen, aktiven Zentren in sechs Klassen unterteilt. Im Periplasma von *E. coli* findet man Vertreter aus drei Klassen: neun Serin-, sechs Metallo-, und drei potentielle Cysteinproteasen. Zwei Proteasen können aufgrund bisher unbekannter Mechanismen noch keiner Klasse zugeteilt werden.

1. 4. 4. 1 Serinproteasen

Abgesehen vom nukleophilen Serinrest im katalytischen Zentrum unterscheiden sich die meisten Serinproteasen in molekularen Strukturen und katalytischen Mechanismen. Sie werden daher, ebenso wie alle anderen Proteinklassen, in ein komplexes System aus Familien und Clans eingeteilt.

DegP

Wie das gut untersuchte Chymotrypsin gehört die periplasmatische Protease DegP zum Clan PA(S). Die katalytische Triade von DegP setzt sich aus Histidin 105, Aspartat 135 und Serin 210 zusammen. Zu den Substraten von DegP gehören fehlgefaltete, periplasmatische Proteine wie MBP und MalS, aber auch defekte Außenmembranproteine wie LamB (Misra, 1991; Betton, 1998; Spiess, 1999).

DegP gehört zur Familie der HtrA (*high temperature requirement*)-Proteasen und weist die typische Architektur dieser Proteingruppe auf. HtrAs besitzen eine Protease-Domäne mit Chymotrypsin-ähnlicher Struktur und eine oder mehrere PDZ-Domänen. PDZ-Domänen dienen der Protein-Protein-Interaktion und binden für gewöhnlich drei bis vier Aminosäuren potentieller Substrate. Neben typischen Substraten können sich auch allosterische Aktivatoren an die PDZ-Domänen anlagern und die Proteaseaktivität verstärken (Wilken, 2004). Die vier humanen HtrAs werden mit schweren Erkrankungen wie der Parkinson- und der Alzheimerschen-Krankheit in Verbindung gebracht (Grau, 2005; Plun-Favreau, 2007).

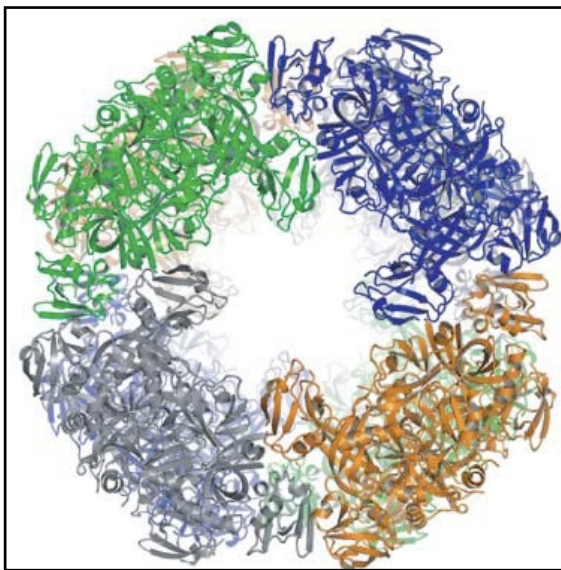


Abb. 1. 6: Kristallstruktur von DegP als 24mer (Krojer, 2008). Die Trimere sind in unterschiedlichen Farben dargestellt.

Die *E.coli* HtrA-Protease DegP wird als 51 kDa großes Vorläuferprotein synthetisiert, das periplasmatische Protein hat eine Größe von 48 kDa. DegP ist ein Hitzeschockprotein und wird von den beiden stress-induzierten Signaltransduktionswegen σ^E und Cpx hochreguliert (siehe 1. 5). Bei niedrigen Temperaturen fungiert DegP als Chaperon. Dabei bindet es an hydrophobe Oberflächen ungefalteter Substrate, schützt diese vor Abbau und assistiert bei ihrer Rückfaltung. Mit steigender Temperatur überwiegt die

Proteaseaktivität und fehlgefaltete Proteine werden abgebaut (Spiess, 1999).

Die Kristallstruktur von DegP verdeutlicht seine Funktion im Periplasma. DegP besteht aus einer konservierten N-terminalen Protease-Domäne und zwei C-terminalen PDZ-Domänen. Im aktiven Zustand bildet das Enzym einen hexameren Komplex, bestehend aus zwei trimeren Ringen. Die Trimere bilden eine trichterähnliche Struktur, aus der die flexiblen PDZ-

Domänen seitlich herausragen (Krojer, 2002). Inkubiert man hexameres DegP mit Substraten *in vitro* entstehen 12- und 24mere, sind die Substrate degradiert, zerfallen die Komplexe wieder in hexamere Strukturen. Das 24mer scheint somit die aktive Form des Proteins darzustellen (siehe Abb. 1. 6). Es hat eine molekulare Masse von 1,13 MDa und sein innerer Hohlraum hat einen Durchmesser von 110 Å, groß genug um OmpA, OmpF, OmpC und LamB in seinem Inneren abzubauen oder das korrekt gefaltete Protein durch das Periplasma zur Außenmembran zu geleiten (Krojer, 2008).

Tsp

Tsp (*tail-specific-protease*) oder Prc (*processing involving C-terminal cleavage*) ist Mitglied der S41-Familie, zu der auch die Tricorn-Protease aus *Thermoplasma acidophilum* gehört. Tricorn degradiert Oligopeptide, die vom Proteasom freigesetzt werden.

Das reife Tsp ist mit 74 kDa eine relativ große Endoprotease, die ungefaltete oder unvollständig synthetisierte Substrate mit hydrophoben C-Termini erkennt (Keiler, 1995 und 1996a). Dazu gehören z. B. das Penicillin-Bindeprotein FtsI (Nagasawa, 1989), SecM (Nakatogawa & Ito, 2001) und das Lipoprotein Nlpl (Tadokoro, 2004). Vermittler dieser Substratspezifität scheint die PDZ-Domäne zu sein, die dem aktiven Zentrum von Tsp N-terminal vorgelagert ist. Das aktive Zentrum besteht aus der katalytische Dyade Serin 452-Lysin 477 (Keiler, 1995). Laut bioinformatischen Berechnungen ist Tsp ein peripheres Membranprotein, das im Periplasma an der Innenmembran assoziiert ist (www.uniprot.org). Die genaue Bedeutung von Tsp *in vivo* ist bisher nicht eindeutig geklärt, vermutlich spielt es beim Schutz der Bakterienzelle vor thermalem und osmotischem Stress eine Rolle (Hara, 1991).

YdgD

YdgD ist eine bisher uncharakterisierte Serinprotease. Alle Erkenntnisse bezüglich dieser Peptidase beruhen ausschließlich auf bioinformatischen Studien. Das 29 kDa große Vorläuferprotein wird der S1B-Familie zugeordnet, zu der auch DegP und sein humanes Homolog HtrA1 gehören. Das aktive Zentrum der putativen Endopeptidase besteht vermutlich aus einer Histidin-Serin-Dyade (www.uniprot.org). Obwohl die potentielle Sekundärstruktur von YdgD einige Charakteristika von Außenmembranproteinen aufweist

(Zhai & Saier, 2002), ist die Serinprotease ein lösliches periplasmatisches Protein (Lütticke, unveröffentlicht).

Die einzigen experimentellen Daten zu *ydgD* stammen aus *Microarray*-Analysen und zeigen eine erhöhte Expression des Gens nach 40-stündigem Wachstum von *E. coli* unter Glucose-limitierten Bedingungen (Franchini & Egli, 2006).

1. 4. 4. 2 Metalloproteasen

Das aktive Zentrum von Metalloproteasen enthält für gewöhnlich ein divalentes Metallion, meistens Zink. Im nativen Zustand liegt das Zinkion tetraedrisch koordiniert vor. Dabei bildet das Metallion einen Komplex mit drei Aminosäureresten des Enzyms (Histidin, Glutamat, Aspartat oder Lysin) und einem Wassermolekül.

PtrA

Die Kristallstruktur von *PtrA* zeigt eine typische α/β -Struktur und zwei distinkte Domänen,

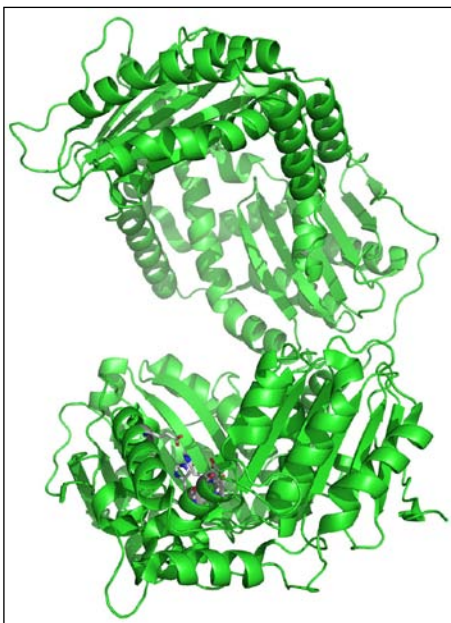


Abb. 1. 7: Kristallstruktur von *PtrA* (Maskos, 2003).

Die Histidin- und Glutamatreste des aktiven Zentrums sind hervorgehoben.

die einen zentralen Hohlraum umschließen (siehe Abb. 1. 7). Diese Struktur erinnert an die Architektur der gut untersuchten Metalloprotease Thermolysin aus *Bacillus thermoproteolyticus* und lässt vermuten, dass sich auch die katalytischen Mechanismen der beiden Proteasen stark ähneln (Maskos, 2003). Erwartungsgemäß trifft man in der *PtrA*-Proteinfamilie M16 auf das HEXXH-Motiv. Dieses Zink-Bindemotiv ist in allen Vertretern der Metalloproteasen mit einem Zinkatom hochkonserviert (Rawlings & Barrett, 1995), allerdings liegt die Sequenz hier in abgewandelter,

invertierter Form vor (HXXE_H). Die beiden Histidine (His₈₈ und His₉₂) sind für die Koordination von Zink verantwortlich, das Glutamat (Glu₉₁) ist in den

katalytischen Mechanismus eingebunden. Ein weiteres Glutamat (Glu₁₆₉) ist ebenfalls an der Zinkbindung beteiligt, die komplette Sequenz des aktiven Zentrums lautet daher HXXE_HX_nE (Becker & Roth, 1993).

PtrA ist mit 107 kDa eine große periplasmatische Metalloprotease, deren Sequenz hochkonserviert ist. Man findet Mitglieder der M16-Familie in vielen Organismen, im Menschen ist es das Insulin-degradierende Enzym IDE (Affholter, 1988). Dieses Protein spaltet Insulin und das Amyloid- β -Protein, welches in engem Zusammenhang mit der Alzheimerschen Krankheit steht (Kurochkin, 2001). Die physiologische Rolle von PtrA im Periplasma ist bis heute ungeklärt, denn außer humanen Proteinen wie Insulin, β -Endorphin und Amyloid- β -Protein (Cornista, 2004) und artifiziellen Fusionsproteinen (Baneyx, 1991) wurden noch keine nativen Substrate gefunden.

YfgC

YfgC ist eine bisher uncharakterisierte Peptidase und alle Daten zu diesem Protein beruhen auf bioinformatischen Studien. Diesen Berechnungen zufolge ist das YfgC-Vorläuferprotein eine 54 kDa große Metalloendopeptidase mit vier *TRP-repeats*. Dieses Sequenzmerkmal besteht typischerweise aus 34 Aminosäuren und ermöglicht Protein-Protein-Interaktionen. YfgC ist eventuell membranständig und besitzt eine σ^E -Konsensussequenz, wird also möglicherweise von Faltungsstress im Periplasma induziert (www.uniprot.org).

YggG und YcaL

Die putativen Metalloendopeptidasen YggG und YcaL gehören beide aufgrund ihrer homologen Sequenzen wie die Hitzeschockprotease HtpX von *E. coli* zur M48B-Familie. Bioinformatischen Analysen zufolge sind YggG und YcaL beide 27 kDa große Lipoproteine (Juncker, 2003), potentiell membranständig und besitzen ein Zinkion pro Untereinheit (www.uniprot.org). *Microarray*-Analysen ergaben, dass der Rcs-Signalweg, welcher bei Schäden der Peptidoglycanschicht induziert wird, möglicherweise YggG reguliert (Hagiwara, 2003).

1. 5 Stressregulation im Periplasma

Alle vorgestellten Proteinfaltungsfaktoren organisieren unter optimalen Wachstumsbedingungen die Membranbiogenese, noch wichtiger sind sie jedoch für den Erhalt der zellulären Homöostase unter Stressbedingungen.

Änderungen des pH-Werts oder erhöhte Temperaturen, die zu fehlgefalteten Proteinen führen, werden von speziellen Signalsystemen erkannt, die daraufhin die Genexpression verschiedener Chaperone, Faltungskatalysatoren und Proteasen regulieren. Die beiden bekanntesten Vertreter dieser Signalsysteme in der Zellhülle von *E. coli* sind das Zweikomponentensystem Cpx und der σ^E -abhängige Signalweg.

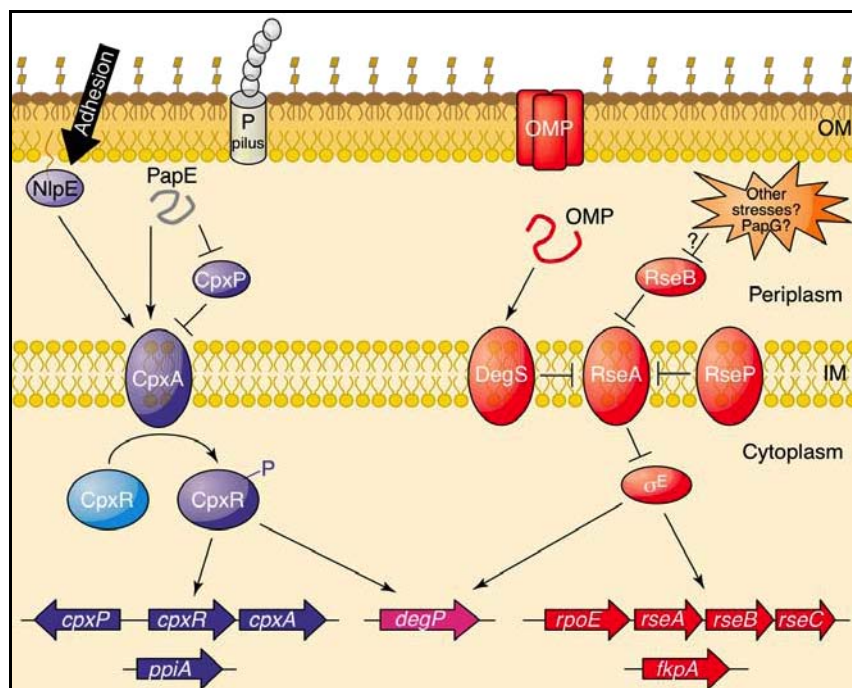


Abb. 1. 8: Stressantwort im Periplasma von *E. coli*

Cpx-Zweikomponentensystem und σ^E -abhängige Signalweg (Ruiz & Silhavy, 2005)

1. 5. 1 Cpx-System

Das Zweikomponentensystem Cpx, bestehend aus der Histidinkinase CpxA und dem Regulator CpxR, wird durch eine Vielzahl von Reizen aktiviert. Neben allgemeinen Defekten der Zellhülle (Danese, 1998) wird das Cpx-System z. B. durch die Überexpression von Pilus-Untereinheiten wie PapE (Jones, 1997) und die NlpE-vermittelte Adhäsion an hydrophobe Oberflächen bei der Biofilmbildung (Otto & Silhavy, 2002), aktiviert. Das integrale

Innenmembranprotein CpxA erhält Informationen zum Zustand der Zellhülle über seine periplasmatische Sensordomäne und leitet das Signal über seine cytoplasmatische Transmitterdomäne weiter an den Transkriptionsfaktor CpxR.

Unter Stressbedingungen beginnt die Signaltransduktionskaskade mit einer Konformationsänderung von CpxA, die zur Autophosphorylierung eines konservierten Histidin-Restes führt. Die Phosphatgruppe wird anschließend auf einen Aspartat-Rest von CpxR übertragen (siehe Abb. 1. 8). Das phosphorylierte CpxR kann nun als Transkriptionsfaktor fungieren, bis es von CpxA wieder dephosphoryliert wird. Zu den von Cpx hochregulierten Genen gehören u.a. *degP*, *skp*, *ppiA*, *ppiD* und *dsbA* (Raivio & Silhavy, 2001).

CpxP ist ein weiteres Mitglied des Cpx-Regulons, dessen genaue Funktionsweise bis heute nicht eindeutig geklärt ist. Das periplasmatische Protein kann durch seine Interaktion mit CpxA den Cpx-Weg inhibieren. Vermutlich bindet CpxP an die Histidinkinase und erst nach seiner Freisetzung kann es zu Konformationsänderungen von CpxA kommen. CpxP könnte auf diese Weise z. B. eine Überreaktion des Systems verhindern (Ruiz & Silhavy, 2005). Isaac *et al.* postulieren außerdem, dass freigesetztes CpxP an fehlgefaltete Proteine bindet, um die effektive Degradation der Substrate durch die Protease DegP zu gewährleisten. Nach dem Abbau der CpxP-Substrat-Komplexe könnte überschüssiges CpxP an CpxA binden und die Stressantwort auf diese Weise beenden (Isaac, 2005).

1. 5. 2 σ^E -abhängiger Signalweg

Während des exponentiellen Wachstums unter normalen Bedingungen werden die meisten *E. coli*-Gene durch ein RNA-Holoenzym transkribiert, das den Sigmafaktor σ^{70} enthält. Alternative Sigmafaktoren kontrollieren Gene, die unter spezifischen Stressbedingungen für das Überleben der Bakterienzelle notwendig sind. Bei cytoplasmatischem Faltungsstress vermittelt z. B. σ^{32} die Transkription spezieller Gene, die für Chaperone und Proteasen codieren.

Das Schlüsselement des σ^E -abhängigen Signalwegs ist der alternative Sigmafaktor RpoE (σ^E). Die σ^E -Antwort wird durch Stressbedingungen ausgelöst, die im Zusammenhang mit fehlgefalteten Proteinen in der Zellhülle stehen, wie z. B. hohe Temperaturen und Ethanol im Medium oder die erhöhte Expression von Außenmembranproteinen (Mecsas, 1993). Zudem beeinflusst die σ^E -Antwort die Lipopolysaccharid-Synthese und ist für das Überleben

von pathogenem *E. coli* im Wirt von großer Bedeutung (Raivio, 2005; Rhodius, 2006).

Die Weiterleitung des Stresssignals von der Zellhülle zum cytoplasmatischen RpoE wird durch eine proteolytische Kaskade gewährleistet (siehe Abb. 1. 8). Der Antisigmafaktor RseA spielt dabei eine bedeutende Rolle. RseA ist ein integrales Innenmembranprotein, es besitzt eine cytoplasmatische Domäne, ein Transmembransegment und eine periplasmatische Domäne. Unter nicht-induzierenden Bedingungen bindet RseA RpoE und sequestriert es an der Membran. Häufen sich ungefaltete Proteine im Periplasma an, werden die C-Termini dieser Polypeptide von der Serinprotease DegS erkannt. Die Bindung der Proteine an die PDZ-Domänen von DegS aktiviert die Protease, welche daraufhin die periplasmatische Domäne von RseA an der Innenmembran schneidet. Ein weiterer proteolytischer Schritt führt zur Prozessierung des verbleibenden RseA-Fragments im Cytoplasma: RseP schneidet RseA ebenfalls an der Innenmembran, die abgetrennte cytoplasmatische Domäne wird durch verschiedene Proteasen wie ClpXP und Lon verdaut. Nachdem RseA degradiert wurde, wird RpoE freigesetzt und kann seine Zielpromotoren regulieren (Hasenbein, 2007). Neben diesen zentralen Elementen ist RseB in die zusätzlichen Kontrollmechanismen des Signalwegs involviert, denn RseB verhindert den Abbau von RseA durch RseP unter Normalbedingungen. Zudem wird vermutet, dass RseB DegS-unabhängig andere periplasmatische Stresssignale vermittelt (Grigorova, 2004).

Zu den von σ^E regulierten Genen gehören u. a. *degP*, *skp*, *fkpA*, *surA*, *dsbC*, *ptrA* und *yfgC* (Rhodius, 2006). Die zeitgleiche Expression von Chaperonen, Prolinisomerasen, Oxidoreduktasen und Proteasen legt nahe, dass die verschiedenen Faktoren in speziellen Faltungswegen organisiert sind. Doch obwohl die meisten Faltungshelfer im Einzelnen detailliert charakterisiert sind, ist über potentielle Netzwerke bisher nichts bekannt.

2 Zielsetzung

Das Innere einer Zelle ist durch sehr hohe Konzentrationen an Proteinen und anderen Makromolekülen charakterisiert. Dieses sogenannte *macromolecular crowding* hat Auswirkungen auf die physikalischen Eigenschaften des Zellmilieus, so werden z. B. intermolekulare Interaktionen energetisch begünstigt. Die Faltung von Präproteinen in ihre korrekte, native 3D-Struktur wird dadurch erheblich erschwert. McNulty *et al.* konnten zeigen, dass humanes, mit der Parkinson-Krankheit assoziiertes α -Synuclein im Periplasma von *E. coli* in seiner ungeordneten, monomeren Struktur stabilisiert wird. Der gleiche Effekt wird *in vitro* nur in Lösung mit 300 mg/ml BSA erreicht (McNulty, 2006). Um die Fehlfaltung von Proteinen zu verhindern bzw. bereits aggregierte Polypeptide abzubauen, haben Zellen ein ausgeklügeltes System aus Chaperonen, Faltungskatalysatoren und Proteasen entwickelt. Es scheint naheliegend, dass diese Faktoren in Faltungswegen und Netzwerken organisiert sind, um die Effizienz der Proteinqualitätskontrolle zu erhöhen und das System zu stabilisieren. Die Chaperone, Faltungskatalysatoren und Proteasen des Periplasmas von *E. coli* sind zwar gut untersucht, doch über potentielle Interaktionen dieser Faktoren ist kaum etwas bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es daher, erste Einblicke in bisher unbekannte Netzwerke der Proteinqualitätskontrolle zu erlangen und ihre Schlüsselemente zu identifizieren.

Durch die Konstruktion von Doppelmutanten, die bestimmte Faltungsfaktoren nicht exprimieren, sollen synthetische Phänotypen ermittelt werden. Anhand dieser Phänotypen können Rückschlüsse auf funktionelle Redundanzen von Faltungsfaktoren gezogen werden. Diese funktionellen Zusammenhänge sollen durch die Untersuchung metabolischer Prozesse und qRT-PCR-Analysen bestätigt werden, indem sie wichtige und detaillierte Informationen zu Faltungsdefekten in der Zellhülle von ausgewählten Doppelmutanten liefern. Schließlich sollen gemeinsame Substrate der Faltungsfaktoren durch umfangreiche Western Blot-Analysen der Deletionsstämme bzw. durch vergleichende biochemische Tests einzelner Faktoren identifiziert werden, um die postulierten Zusammenhänge einzelner Faktoren auf Proteinebene genauer untersuchen zu können.

3 Material und Methoden

3. 1 Material

3. 1. 1 Nährmedien

Je nach Versuch wurden zu untersuchende *E. coli*-Stämme in M9-Minimalmedium oder NZA-Vollmedium kultiviert.

M9- Salze

42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

15 g KH_2PO_4

2,5 g NaCl

5 g NH_4Cl

ad 1 l dH_2O

M9-Minimalmedium

200 ml M9 Salze

2 ml 1 M MgSO_4

20 ml 20 % Glucose

100 μl 1 M CaCl_2

ad 1 l dH_2O

NZA-Medium

10 g NZ-Amine

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1 l dH_2O

NZA-Platten

NZA-Medium

15 g Bacto-Agar

ad 1 l dH_2O

Je nach Bedarf wurde dem Medium Antibiotika (siehe 3. 1. 2) und/oder IPTG bzw. AHT (siehe 3. 1. 3) zugegeben.

3. 1. 2 Antibiotika

Tab. 3. 1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$ Medium]
Ampicillin	200
Chloramphenicol	30
Kanamycin	100
Tetrazyklin	10

3. 1. 3 Weitere Medienzusätze

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) wurde als 1 M Stammlösung in *A. dest.* gelöst und steril filtriert. Je nach Versuchsbedingung wurden Expressionsstämme mit einer Endkonzentration von 10 μM bis 1 mM IPTG induziert. AHT (Anhydrotetrazyklin) wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml in DMF gelöst und steril filtriert. Je nach Versuchsbedingung wurden Expressionsstämme mit einer Endkonzentration von 20 ng/ml bis 100 ng/ml AHT induziert.

3. 1. 4 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden für allgemeine Arbeiten (Klonierung, Überexpression, P1-Transduktion, etc.) verwendet:

Tab. 3. 2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft
AB15	<i>degP::tet</i>	A. Beil, Laborsammlung
BW30270	<i>F-</i> , <i>lambda-</i> , <i>ilvG-</i> , <i>rfb-50</i> , <i>rph+</i> , <i>fnr+</i>	CGSC – The Coli Genetic Stock Center, Yale University
CS64	Δ <i>fhuA dsbA::kan</i>	C. Spiess, Laborsammlung
DH5 α	<i>F-</i> , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>deoR</i> [Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15], <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , (<i>res-</i> , <i>mod+</i>)	Hanahan 1983

Fortsetzung Tab. 3. 2:

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft
GM2163	<i>dam13::Tn9 cm^R dcm-6 str^R</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
JD27017	<i>KP7600 yfgC::miniTn10kan</i>	T.Miki, Shigen
JCR4	<i>skp::kan</i>	J. Coleman, 1994
JW0173	BW25113 <i>skp::kan</i>	Keio Collection, Shigen
JW0892	BW25113 <i>ycal::kan</i>	Keio Collection, Shigen
JW1590	BW25113 <i>ydgD::kan</i>	Keio Collection, Shigen
JW1819	BW25113 <i>tsp::kan</i>	Keio Collection, Shigen
JW2479	BW25113 <i>yfgC::kan</i>	Keio Collection, Shigen
JW2789	BW25113 <i>ptrA::kan</i>	Keio Collection, Shigen
JW2889	BW25113 <i>yggE::kan</i>	Keio Collection, Shigen
JW2903	BW25113 <i>yggG::kan</i>	Keio Collection, Shigen
JW3202-1	BW25113 <i>degQ::kan</i>	Keio Collection, Shigen
JW3326	BW25113 <i>ppiA::kan</i>	Keio Collection, Shigen
JW3832	BW25113 <i>dsbA::kan</i>	Keio Collection, Shigen
KU98	DHB4 <i>degP::kan treA::spec</i>	Laborsammlung
MG1655 <i>ptrA::kan</i>	MG1655 <i>ptrA::kan</i>	Blattner laboratory
MG1655 <i>tsp::kan</i>	MG1655 <i>tsp::kan</i>	Blattner laboratory
MM7	W3110 <i>ppiA::kan</i>	Laborsammlung
MM12	W3110 <i>surA::cm</i>	Laborsammlung
STL117	<i>dsbC::miniTn10kan</i>	Laborsammlung
TM12	W3110 <i>fkpA::cm</i>	Laborsammlung
TM50	W3110 <i>ppiD::tet</i>	Laborsammlung

Folgende Deletionsstämme wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels P1-Transduktion hergestellt und charakterisiert:

Tab. 3. 3: Deletionsstämme, im Rahmen dieser Arbeit hergestellt

Stamm	Relevanter Genotyp	Stamm	Relevanter Genotyp
JB1	BW30270 <i>ppiA::kan</i>	JB29	BW30270 <i>tsp::kan ppiD::tet</i>
JB2	BW30270 <i>surA::kan</i>	JB30	BW30270 <i>ydgD::kan ppiD::tet</i>
JB3	BW30270 <i>ppiD::tet</i>	JB31	BW30270 <i>yfgC::kan ppiD::tet</i>
JB4	BW30270 <i>fkpA::cm</i>	JB32	BW30270 <i>yggG::kan ppiD::tet</i>
JB5	BW30270 <i>dsbA::kan</i>	JB33	BW30270 <i>ycaL::kan ppiD::tet</i>
JB6	BW30270 <i>dsbC::kan</i>	JB35	BW30270 <i>dsbA::kan fkpA::cm</i>
JB7	BW30270 <i>skp::kan</i>	JB36	BW30270 <i>dsbC::kan fkpA::cm</i>
JB8	BW30270 <i>degP::kan</i>	JB37	BW30270 <i>skp::kan fkpA::cm</i>
JB9	BW30270 <i>degP::tet</i>	JB38	BW30270 <i>degP::kan fkpA::cm</i>
JB11	BW30270 <i>ptrA::kan</i>	JB40	BW30270 <i>ptrA::kan fkpA::cm</i>
JB12	BW30270 <i>tsp::kan</i>	JB41	BW30270 <i>tsp::kan fkpA::cm</i>
JB13	BW30270 <i>ydgD::kan</i>	JB42	BW30270 <i>ydgD::kan fkpA::cm</i>
JB14	BW30270 <i>yfgC::kan</i>	JB43	BW30270 <i>yfgC::kan fkpA::cm</i>
JB15	BW30270 <i>yggG::kan</i>	JB44	BW30270 <i>yggG::kan fkpA::cm</i>
JB16	BW30270 <i>ycaL::kan</i>	JB45	BW30270 <i>ycaL::kan fkpA::cm</i>
JB19	BW30270 $\Delta ydgD$	JB48	BW30270 <i>dsbA::kan degP::tet</i>
JB20	BW30270 $\Delta yggG$	JB49	BW30270 <i>dsbC::kan degP::tet</i>
JB21	BW30270 $\Delta ycaL$	JB50	BW30270 <i>skp::kan degP::tet</i>
JB23	BW30270 <i>dsbA::kan ppiD::tet</i>	JB52	BW30270 <i>ptrA::kan degP::tet</i>
JB24	BW30270 <i>dsbC::kan ppiD::tet</i>	JB53	BW30270 <i>tsp::kan degP::tet</i>
JB25	BW30270 <i>skp::kan ppiD::tet</i>	JB54	BW30270 <i>ydgD::kan degP::tet</i>
JB26	BW30270 <i>degP::kan ppiD::tet</i>	JB55	BW30270 <i>yfgC::kan degP::tet</i>
JB28	BW30270 <i>ptrA::kan ppiD::tet</i>	JB56	BW30270 <i>yggG::kan degP::tet</i>

Fortsetzung Tab. 3. 3:

Stamm	Relevanter Genotyp	Stamm	Relevanter Genotyp
JB57	BW30270 <i>ycaL::kan degP::tet</i>	JB100	BW30270 $\Delta ydgD$ <i>yfgC::kan</i>
JB59	BW30270 <i>ppiA::kan degP::tet</i>	JB101	BW30270 $\Delta yggG$ <i>yfgC::kan</i>
JB60	BW30270 <i>dsbA::kan surA::cm</i>	JB102	BW30270 $\Delta ycaL$ <i>yfgC::kan</i>
JB61	BW30270 <i>dsbC::kan surA::cm</i>	JB108	BW30270 $\Delta yggG$ <i>ydgD::kan</i>
JB63	BW30270 <i>ptrA::kan surA::cm</i>	JB109	BW30270 $\Delta ycaL$ <i>ydgD::kan</i>
JB64	BW30270 <i>ydgD::kan surA::cm</i>	JB111	BW30270 $\Delta ycaL$ <i>yggG::kan</i>
JB65	BW30270 <i>yfgC::kan surA::cm</i>	JB115	BW30270 <i>ppiA::kan</i>
JB66	BW30270 <i>yggG::kan surA::cm</i>	JB116	BW30270 <i>dsbA::kan</i>
JB67	BW30270 <i>ycaL::kan surA::cm</i>	JB117	BW30270 <i>skp::kan</i>
JB70	BW30270 $\Delta ydgD$ <i>ppiA::kan</i>	JB118	BW30270 <i>ptrA::kan</i>
JB71	BW30270 $\Delta yggG$ <i>ppiA::kan</i>	JB119	BW30270 <i>tsp::kan</i>
JB72	BW30270 $\Delta ycaL$ <i>ppiA::kan</i>	JB120	BW30270 <i>yfgC::kan</i>
JB75	BW30270 $\Delta ydgD$ <i>dsbA::kan</i>	JB121	BW30270 $\Delta ppiA$
JB76	BW30270 $\Delta yggG$ <i>dsbA::kan</i>	JB122	BW30270 Δskp
JB77	BW30270 $\Delta ycaL$ <i>dsbA::kan</i>	JB123	BW30270 $\Delta ptrA$
JB80	BW30270 $\Delta ydgD$ <i>dsbC::kan</i>	JB124	BW30270 Δtsp
JB81	BW30270 $\Delta yggG$ <i>dsbC::kan</i>	JB125	BW30270 $\Delta yfgC$
JB82	BW30270 $\Delta ycaL$ <i>dsbC::kan</i>	JB126	BW30270 $\Delta ppiA$ <i>dsbA::kan</i>
JB85	BW30270 $\Delta ydgD$ <i>skp::kan</i>	JB127	BW30270 Δskp <i>ppiA::kan</i>
JB86	BW30270 $\Delta yggG$ <i>skp::kan</i>	JB128	BW30270 Δskp <i>dsbA::kan</i>
JB87	BW30270 $\Delta ycaL$ <i>skp::kan</i>	JB129	BW30270 Δskp <i>ptrA::kan</i>
JB90	BW30270 $\Delta ydgD$ <i>ptrA::kan</i>	JB130	BW30270 Δskp <i>tsp::kan</i>
JB91	BW30270 $\Delta yggG$ <i>ptrA::kan</i>	JB131	BW30270 Δskp <i>yfgC::kan</i>
JB92	BW30270 $\Delta ycaL$ <i>ptrA::kan</i>	JB132	BW30270 $\Delta ptrA$ <i>ppiA::kan</i>
JB95	BW30270 $\Delta ydgD$ <i>tsp::kan</i>	JB133	BW30270 $\Delta ptrA$ <i>dsbA::kan</i>
JB96	BW30270 $\Delta yggG$ <i>tsp::kan</i>	JB134	BW30270 $\Delta ptrA$ <i>tsp::kan</i>
JB97	BW30270 $\Delta ycaL$ <i>tsp::kan</i>	JB135	BW30270 $\Delta ptrA$ <i>yfgC::kan</i>

Fortsetzung Tab. 3. 3:

Stamm	Genotyp	Stamm	Genotyp
JB136	BW30270 Δtsp <i>ppiA::kan</i>	JB141	BW30270 $\Delta ppiA$ <i>dsbC::kan</i>
JB137	BW30270 Δtsp <i>dsbA::kan</i>	JB142	BW30270 Δskp <i>dsbC::kan</i>
JB138	BW30270 Δtsp <i>yfgC::kan</i>	JB143	BW30270 $\Delta ptrA$ <i>dsbC::kan</i>
JB139	BW30270 $\Delta yfgC$ <i>ppiA::kan</i>	JB144	BW30270 Δtsp <i>dsbC::kan</i>
JB140	BW30270 $\Delta yfgC$ <i>dsbA::kan</i>	JB145	BW30270 $\Delta yfgC$ <i>dsbC::kan</i>

3. 1. 5 Vektoren und Plasmide**Tab. 3. 4: Verwendete Vektoren und Plasmide**

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
pASK-IBA32	ORF mit <i>ompA</i> -Signalsequenz	amp	IBA, Göttingen
pASK-KO	pASK-IBA32 ohne <i>ompA</i> -Signalsequenz und His-Tag	amp	diese Arbeit
pCS19	pQE60 von Qiagen mit <i>lacIq</i> -Gen	amp	Spiess, 1999
pCS20	pCS19 mit <i>degP</i>	amp	Spiess, 1999
pCS21	pCS19 mit <i>degPS210A</i>	amp	Spiess, 1999
pDegP	pASK-KO mit <i>degP</i>	amp	diese Arbeit
pDegP-SA	pASK-KO mit <i>degPS210A</i>	amp	diese Arbeit
pDsbAexp	pCS19 mit <i>dsbA</i>	amp	diese Arbeit
pDsbA	pASK-KO mit <i>dsbA</i>	amp	diese Arbeit
pPtrA	pASK-IBA32 mit <i>ptrA</i>	amp	diese Arbeit
pPtrA-EQ	pASK-IBA32 mit <i>ptrAE91Q</i>	amp	diese Arbeit
pTspexp	pCS19 mit <i>tsp</i>	amp	diese Arbeit
pTspSAexp	pCS19 mit <i>tspS452A</i>	amp	diese Arbeit
pTsp	pASK-KO mit <i>tsp</i>	amp	diese Arbeit
pTsp-SA	pASK-KO mit <i>tspS452A</i>	amp	diese Arbeit
pYfgC	pASK-IBA32 mit <i>yfgC</i>	amp	C. Lütticke, ZMB
pYfgC-EQ	pASK-IBA32 mit <i>yfgCE137Q</i>	amp	C. Lütticke, ZMB

3. 1. 6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) bezogen.

Tab. 3. 5: Verwendete Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz (5'-3')	Verwendung
aceEfor	GTGATGCTGAAGAACAAGTC	qRT-PCR
aceErev	CTGTAAATACCAATCTGACGG	
fhuAfor	CTTCTCCGTTGATACCCA	
fhuArev	CATTACGCATACGCATAAAGTC	
gapAfor	GACCGTTCGTCTGGAAAAAG	
gapArev	ACGTCATCTTCGGTGTAGCC	
lamBfor	GTGCTCAAAGTAAATACCGT	
lamBrev	CTCTTATCGCCCTCTTTCC	
ompWfor	CCAGCAGCAAATTCCGTC	
ompWrev	ACTGAGATCGGAAAGCCC	
rpoEfor	AGCTGAAAACCTCGAAAGTGG	
rpoErev	CCGGGAGGGACTCAATAGTT	
spyfor	ACAAAGGCAAGTTCGGTC	
spyrev	GTTTCATCTGGTCACGCT	
k1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Verifikation P1-Transduktion
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	
ptrAP1for	TGCGTTAACGTGTTGAATCTG	
ptrAP1rev	AGGTGACCACCAGCAGTTCT	
ycaL1	AGGCAGCCTGAATGAACAAC	
ycaL2	ACGTTGTGTGCAAAAACCAG	
ydgD1	GCCGTTATCGCTTTGAGTTC	
ydgD2	CTGTCGCTTATGCATTGTGG	
yggG1	CGCTGCGCTTTTCCTTATAC	
yggG2	GTGCCATTCATGTCAGATGC	

Fortsetzung Tab. 3. 5:

Name	Nukleotidsequenz (5'-3')	Verwendung
dsbAfor	GAGAGTAGACCATGGCTAAAAAGATTG	Klonierung
dsbArev	GTAATTTACATTGGATCCTTTTTTCTCG	
Kompfor	AAAAAATCTAGAAAAGAGGAGAAATTAACCATGG	
Komprev	AAAGGTACCGTGATGGTGATGGTGTTAAGATCT	
ptrAfor	TTTGAATTCGAAACGGGATGGCAGCCGAT	
ptrArev	AAAAGTCGACACACTCATTCTTTTCACTCATCAGGGGC	
tspfor	TTTCCAGCCATGGCTAACATGTTTTTTAG	
tsprev	TTGTGCCTGATTGAGATCTCTTGACG	
ptrAE91Qfor	CAGGGGCTGGCACATTACCTGCAGCATATGAGTCTGATG	Oligomutagenese
ptrAE91Qrev	CATCAGACTCATATGCTGCAGGTAATGTGCCAGCCCCTG	
tspS452Afor	CTGGTTGACCGCTTCAGTGCTGCAGCTTCAGAAATCTTTG	
tspS452Arev	CAAAGATTTCTGAAGCTGCAGCACTGAAGCGGTCAACCAG	

3. 1. 7 Antikörper

Tab. 3. 6: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Organismus	Herkunft
Penta-His Antikörper	Maus	Qiagen, Hilden
alle weiteren Primärantikörper	Kaninchen	Laborsammlung

Tab. 3. 7: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Organismus	Herkunft
Anti-Maus-IgG-AP	Ziege	Sigma-Aldrich, München
polyklonaler anti-Kaninchen Ig/AP	Ziege	Dako, Glostrup, Dänemark

3. 1. 8 Proteine und Enzyme

Tab. 3. 8: Verwendete Proteine und Enzyme

Protein/Enzym	Hersteller
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, München
DNAseI	Fermentas, St-Leon-Rot
Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Phusion High Fidelity Polymerase Finnzymes	NEB, Ipswich, MA, USA
Restriktionsendonucleasen	NEB, Ipswich, MA, USA
Taq DNA Polymerase	NEB, Ipswich, MA, USA

3. 1. 9 Protein- und Nukleinsäurestandards

Tab. 3. 9: Verwendete Protein- und Nukleinsäurestandards

Standard	Hersteller
FPLC Gelfiltration LMW&HMW	Standard Bio-Rad, München
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, München
Prestained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München
Unstained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München
Quick-Load 2-Log DNA Ladder	NEB, Ipswich MA, USA

3. 1. 10 Komplettsysteme

Tab. 3. 10: Verwendete Komplettsysteme

Komplettsystem	Hersteller
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St-Leon-Rot
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

Fortsetzung Tab. 3. 10:

Komplettsystem	Hersteller
QPCR SYBR Green Mix	Thermo Scientific, Waltham MA, USA
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim
RNeasy® Protect Mini Kit	Qiagen, Hilden

3. 1. 11 Allgemeine Chemikalien

Die für die Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

3. 1. 12 Verbrauchsmaterialien

Deoxynucleotide Solution Mix	New England Biolabs, Beverly, USA
Dialysemembranen Zellu TransT1	Roth, Karlsruhe
Protino Ni-TED 2000	Macherey-Nagel, Düren
PVDF Membran Amersham Hybond P	GE Healthcare, München
SFCA bottle top filters 500 ml, 0,2 µM	Thermo Fisher Scientific, NY, USA
Sterilfilter 0,45 µm Supor Membrane	PALL, East Hills, NY, USA
Vivaspin 15R, 5 kDa-100 kDa	Vivascience, Stonehouse, UK
Zellulosemembran Whatman, 19x 29 cm	GE Healthcare, München

3. 1. 13 Geräte

Absaugpumpe Typ N811KN.18 KNF	Neuberger, Freiburg
Autoklav	BeliMed, Mühlheim am Inn
DNA-Gelelektrophoresekammer	peqlab, Erlangen
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad, München
Horizontalschüttler	Grant Böckler, Cambridge, GB
Inkubationsschüttler	Innova 44

Magnetenrührer RH basic 2	IKA, Staufen
M-100L Microfluidizer Processor	Microfluidics, Newton, USA
PAGE-Kammer Mini Trans-Blot Cell	BioRad, München
PCR-Gerät Personal	Biometra, Göttingen
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Schott, Mainz
qRT-PCR Gerät Rotor-Gene 3000	Corbett Research, Cambridge, GB
Speed-Vac Concentrator 5301-R	Eppendorf, Hamburg
Spektrometer Genios Pro	Tecan, Crailsheim
Spektralphotometer Smart Spec Plus	Bio-Rad, München
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator Gel Imager	Intas, Göttingen
Waagen	Kern, Balingen-Frommern
Western-Blot Apparatur Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Zentrifugen:	
Standzentrifuge Avanti J-E	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Tischzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Alle nicht aufgeführten Geräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

3. 1. 14 Software

Acrobate Reader [®] 8.0	Adobe System Inc, San Jose
Chemdraw Ultra 12.0	CambridgeSoft, Cambridge, USA
Office 2008	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Photoshop [®] 8	Adobe System Inc, San Jose, USA
PerlPrimer	Marshall, 2004
RotorGene	Corbett Research, Qiagen, Hilden

3. 2 Methoden

3. 2. 1 Molekularbiologische Methoden

3. 2. 1. 1 Allgemeine Methoden

In dieser Arbeit wurden grundlegende molekularbiologische Techniken wie die Herstellung kompetenter Zellen, die Transformation von Bakterien, DNA-Präparation, Restriktion und Ligation, sowie die Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese und ihre anschließende Aufreinigung angewendet. Die Durchführung dieser Methoden erfolgte nach den Angaben der jeweiligen Hersteller der entsprechenden Enzyme und Komplettsysteme bzw. nach Maniatis (1989).

3. 2. 1. 2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für Klonierungen wurden ausschließlich Oligonukleotide verwendet, die nach der Synthese über die HPLC gereinigt wurden (siehe 3. 1. 6).

Als Anlagerungstemperatur wurden von der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Oligonukleotide drei Grad Celsius abgezogen. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem *Biometra T Personal Cycler* durchgeführt. Das Protokoll wurde entsprechend den Herstellerangaben (*Phusion High Fidelity Polymerase*, NEB) durchgeführt und den verwendeten Oligomeren bzw. der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst.

3. 2. 1. 3 Oligomutagenese

Zur Einführung von ortsspezifischen Mutationen in ein Gen wurden zwei komplementäre Oligonukleotide generiert, die in Tabelle 3. 5 zusammengefasst sind. Der gezielte Basenaustausch wurde so gewählt, dass zusätzlich zur gewünschten Mutation eine neue Restriktionsschnittstelle entstand. Auf diese Weise war nach der Oligomutagenese eine Selektion positiver Klone durch Restriktion möglich.

Die PCR wurde nach Herstellerangaben (*Pfu Ultra Polymerase*, Stratagene) durchgeführt. Nach der PCR-Reaktion wurden dem Ansatz 2 µl des Restriktionsenzym DpnI zugsetzt, um die methylierte Ausgangs-DNA zu verdauen. Der Verdau wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt. Anschließend folgte eine Transformation kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock.

3. 2. 1. 4 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung von Bakterien-Kolonien auf die korrekte Deletion nach einer P1-Transduktion wurde die PCR direkt von den Kolonien mit spezifischen Primern (siehe Tab. 3. 5) durchgeführt. Hierzu wurde eine Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher in 20 µl H₂O überführt, 5 min bei 99°C inkubiert und 10 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, 13000 rpm, RT). Anschließend wurden 2 µl des Überstandes als *template* in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR erfolgte nach Herstellerangaben (*Taq* DNA Polymerase, NEB).

Die Deletion in Stämmen der Keio-Kollektion konnte sehr detailliert mit speziellen *Primerpaaren* (siehe Tab. 3. 5) lokalisiert werden. Hierzu wurden pro Deletionsstamm zwei Kontroll-PCR durchgeführt: eine Reaktion mit *Primer 1* und k 1 und eine weitere Reaktion mit *Primer 2* und k 2. Die korrekte Länge der Amplifikate ergab sich aus der Bindestelle von *Primer 1* und *Primer 2* im jeweiligen Gen (siehe Abb. 3. 1).

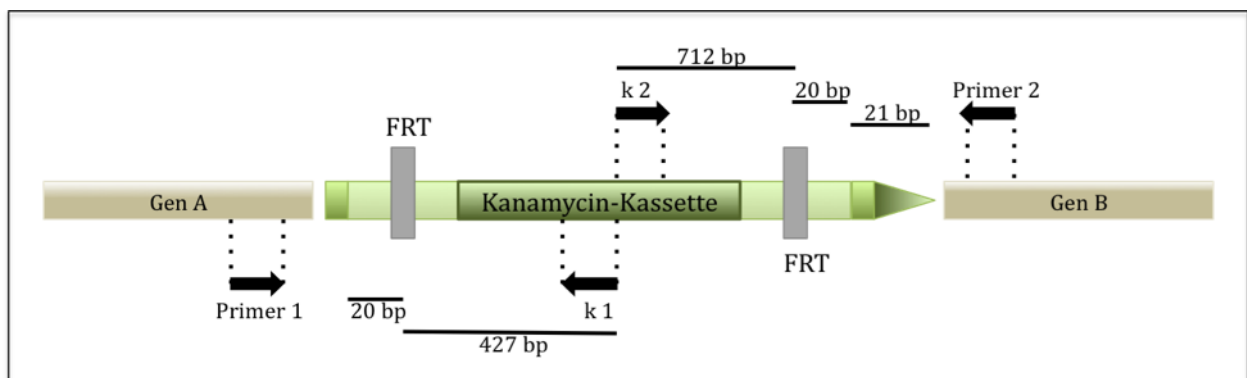


Abb. 3. 1: *Primer-Design* bei Deletionsstämmen der Keio-Kollektion (nach Baba, 2006).

3. 2. 1. 5 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit dem *RNeasy[®] Protect Mini Kit* von Qiagen durchgeführt.

Bakterien einer 5 ml-Übernachtskultur wurden einmal in M9-Minimalmedium gewaschen und anschließend in 5 ml frisches M9-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 überimpft. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert und in der logarithmischen Phase geerntet. Hierfür wurden 5x10⁸ Zellen abzentrifugiert, in 500 µl M9-Medium aufgenommen und sofort mit 1 ml *RNA Protect Bacteria Reagent* von Qiagen durch kurzes Vortexen gemischt, um die RNA zu stabilisieren. Nach 5 min Inkubation wurden die Proben bei 5000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand schließlich verworfen. Das Pellet wurde über Nacht bei -20°C gelagert,

am nächsten Tag in 100 µl Lysis-Puffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Proben mit 350 µl RLT-Puffer von Qiagen und 250 µl 100% Ethanol vermischt und auf die *RNeasy® Mini Spin*-Säule gegeben. Die nachfolgenden Wasch- und Elutionsschritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Lysis-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8

1 mM EDTA

1 mg/ml Lysozym

3. 2. 1. 6 cDNA-Synthese

Vor der cDNA-Synthese wurden 3 µg RNA mit DNaseI von Fermentas nach Angaben des Herstellers verdaut. Aus diesem Ansatz wurden 3 µl entnommen und in die cDNA-Synthese eingesetzt. Die Reaktion wurde mit Hexamer-Oligonukleotiden zufälliger Sequenz (*Random Hexamers* des *First Strand cDNA Synthesis Kit* von Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3. 2. 1. 7 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Quantifizierung spezifischer RNA bzw. cDNA zur Expressionsanalyse einzelner Gene erfolgte mit Hilfe der qRT-PCR.

Design von qRT-PCR-Primern

Primer für die qRT-PCR (siehe Tab. 3. 5) wurden mit Hilfe des Programms *Perl Primer* entworfen. Dabei wurden folgende Bedingungen gewählt:

- T_m der *Primer* zwischen 58°C und 60°C
- Maximal 2°C Temperaturdifferenz zwischen den T_m des *sense*- und *antisense*-Primers
- G/C-Gehalt zwischen 40% und 60%
- *Primer*-Länge zwischen 19 und 21 nt
- Länge des Amplicons zwischen 90 und 150 bp

Die *Primer*-Paare wurden mit Hilfe des Programms auf die Möglichkeit intra- und intermolekulare Sekundärstrukturen zu bilden, untersucht. Das *Primer*-Paar mit der geringsten Neigung zur Sekundärstrukturbildung wurde durch Datenbanksuche (www.ecogene.org/blast.php) auf Spezifität hinsichtlich des Zielgens untersucht.

Bestimmung der *Primer*-Effizienz

Die Effizienz der entworfenen *Primer* wurde mit Hilfe eines Gemischs aus den hergestellten cDNA-Proben (siehe 3. 2. 1. 6) bestimmt.

Jeweils in 3fach-Bestimmung unter Verwendung der zu untersuchenden *Primer* wurden 0,02 ng, 0,2 ng, 2 ng, 20 ng, 50 ng oder 100 ng in die Reaktion eingesetzt. Mit Hilfe des Programms *RotorGene* wurden in einem Diagramm der Logarithmus der Konzentration auf der Abszisse und die C(T)-Werte auf der Ordinate aufgetragen. Die Steigung m der resultierenden Gerade wurde über lineare Regression bestimmt. Mit Hilfe der Steigung m konnte dann die Amplifikationseffizienz E mit Hilfe folgender Formel berechnet werden:

$$E = 10^{(-1/m)}$$

Für die qRT-PCR wurden nur solche *Primer* verwendet, deren Effizienz zwischen 1,8 und 2,1 lag.

qRT-PCR-Ansatz

Jede qRT-PCR-Messung wurde in Dreifachbestimmung mit Hilfe des *QPCR SYBR Green Mix* von Thermo Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt. In jede Reaktion wurden 45 ng cDNA eingesetzt, außerdem wurde für jedes *Primer*paar eine Kontrolle ohne cDNA mitgeführt. Die Ergebnisse der Messung werden in *Microsoft Excel* importiert und wie im Folgenden beschrieben ausgewertet.

Auswertung

Für die Berechnung der relativen Expressionlevel wurde die sogenannte Pfaffl -Methode (Pfaffl, 2001) verwendet:

$$\frac{(E_{Ziel})^{\Delta C(T)_{Ziel(Kontrolle-Probe)}}}{(E_{Ref})^{\Delta C(T)_{Ref(Kontrolle-Probe)}}}$$

Dabei sind E_{Ziel} und E_{Ref} die relativen *Primer*-Effizienzen (siehe oben) für das Transkript des Zielgens bzw. des Referenzgens. Die $C(T)$ -Werte der Proben werden mit Hilfe des Programms *RotorGene* bestimmt. Dafür wird die logarithmische Darstellung der Fluoreszenzkurven ausgewählt, die durchschnittliche Hintergrundfluoreszenz der Zyklen zwei bis zehn subtrahiert und der Schwellenwert der Fluoreszenz auf 0,025 gesetzt. Der $C(T)$ -Wert gibt den Zyklus an, an dem die Fluoreszenz in der Probe den Schwellenwert erreicht, wobei umso weniger Zyklen zum Erreichen des Schwellenwerts benötigt werden, je mehr cDNA in der Probe am Anfang der qRT-PCR-Reaktion vorhanden ist.

Die Expression des Zielgens wurde außerdem relativ zu mehreren Referenzgenen bestimmt, um Fehler bei der Bestimmung der relativen Expression des Zielgens aufgrund möglicherweise vorhandener Regulationsmechanismen der Referenzgene zu minimieren. Die gemessenen Referenzgene wurden mit Hilfe des Makros *GeNorm* für *Microsoft Excel* anhand eines Genexpressionsnormalisierungsfaktors aus dem geometrischen Mittel der Referenzgene hinsichtlich der Stabilität ihrer Expression bewertet (Vandesompele, 2002). Die stabilsten Referenzgene (*gapA* und *aceE*) konnten daraufhin ausgewählt und ihr geometrisches Mittel für die Normalisierung verwendet werden.

3. 2. 2 Mikrobiologische Methoden

3. 2. 2. 1 Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde auf Festmedium (NZA-Agarplatten) oder in Flüssigkultur kultiviert. Je nach Versuchsbedingungen betrug die Temperatur zur Anzucht 28°C - 43°C. Flüssigkulturen wurden von Stammpplatten mit Einzelkolonien beimpft. Kulturvolumina bis 5 ml wurden auf einem Brutroller, größere Volumina auf einem Rundschüttler bei 180 rpm inkubiert. Nach einer Anzucht von mindestens 12 h wurden die Kulturen als Übernachtskultur (ÜN-Kultur) bezeichnet.

3. 2. 2. 2 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zellzahl in *E. coli*-Flüssigkulturen wurde durch das Messen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Bio-Rad-Photometer bestimmt. Nach Miller entspricht eine OD₆₀₀ von 1 etwa einer Zellzahl von 10⁹ Zellen pro ml (Miller, 1972).

3. 2. 2. 3 Herstellung des P1-Lysats nach Miller (1972)

5 ml Übernachtskultur des Donorstammes wurden 1:50 in 5 ml NZA-Medium verdünnt und bis zur Log-Phase bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl P1vir-Starterlysat und 25 µl 1 M CaCl₂ wurde die infizierte Kultur bis zur vollständigen Zelllyse bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Abschließend wurde das Lysat mit einigen Tropfen Chloroform vermischt und verbleibende Zelltrümmer bei 4000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Schraubdeckelglas überführt und bei 4°C aufbewahrt.

3. 2. 2. 4 P1-Transduktion nach Miller (1972)

Die P1-Transduktion wurde angewendet, um Antibiotikaresistenzen von einem Bakterienstamm auf einen anderen zu übertragen. Durch die homologe Rekombination der Resistenzgene des Donors in das Chromosom des Rezipienten konnten spezifische Deletionen im gewünschten Stammb Hintergrund hergestellt werden.

5 ml Übernachtskultur des Rezipientenstammes wurden 1:50 in 5 ml NZA-Medium verdünnt und bis zur Log-Phase bei 37°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min bei 4000 rpm) wurden die pelletierten Bakterien in 1,25 ml 100 mM MgSO₄ und 12,5 µl 0,5 M CaCl₂ aufgenommen. 100 µL dieser Suspension wurden mit 10 µl P1-Lysat versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurden 100 µL des P1-Lysats ohne Bakterienzusatz als Kontrolle mitgeführt. Nach der Zugabe von 100 µL 1 M Na-Citrat und einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 4000 rpm wurde das Bakterienpellet in 1 ml Nährmedium mit 20 mM Na-Citrat resuspendiert und für eine Stunde bei 37°C zur phänotypischen Expression auf dem Schüttler inkubiert.

Nach dem Ausplattieren der Bakteriensuspension und Übernachtinkubation bei 28°C auf dem entsprechenden Selektionsmedium, erfolgte die Aufreinigung der transduzierten Bakterien durch dreimaliges Ausstreichen auf Na-Citrat-Platten.

Alle Transduktanden wurden mittels Western Blot- oder PCR-Analyse (siehe 3. 2. 1. 4) auf ihre Korrektheit überprüft.

3. 2. 3 Proteinbiochemische Methoden

3. 2. 3. 1 β -Galactosidase-Assay

Zur Charakterisierung der Membranintegrität von *E. coli*-Mutanten wurde die spezifische β -Galactosidase-Aktivität im Kulturüberstand gemessen.

Hierfür wurden 5 ml NZA-Medium mit 50 μ M IPTG versetzt und mit 100 μ l einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes überimpft. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte ($OD_{600} = 1$) wurde 1 ml der Kultur bei 4°C und 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert. 50 μ l des Kulturüberstandes wurden mit 500 μ l Z-Puffer und 100 μ l ONPG (Stammlösung: 4 mg/ml) vermischt und anschließend bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 min mit 250 μ l 1 M Na_2CO_3 gestoppt und die Intensität des Farbumschlages durch die Messung der Extinktion bei 420 nm bestimmt.

Die spezifische β -Galactosidase-Aktivität in mmol/min x ml ergibt sich aus:

$$\frac{\Delta E_{420} \times Vol_{End}}{OD_{600} \times t \times d \times \varepsilon \times Vol_{Zellen}}$$

ΔE_{420} : gemessene Extinktionsänderung der Reaktionslösung bei 420 nm

OD_{600} : optische Dichte der Bakterienkultur bei 600 nm

Vol_{End} : Endvolumen des Reaktionsansatzes

Vol_{Zellen} : eingesetztes Volumen des Kulturüberstandes

t: Reaktionszeit in Minuten

d: Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ε : Extinktionskoeffizient von o-Nitrophenol (0,0045 ml x mmol⁻¹ x cm⁻¹)

Z-Puffer60 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O40 mM NaH₂PO₄ x H₂O

10 mM KCl

1 mM MgSO₄ x H₂O*3. 2. 3. 2 Gesamtproteinisolierung aus E. coli*

Die *E. coli*-Testkultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und 1 ml der Kultur entnommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (3 min, 13000 rpm, RT) wurde das Zellsediment in 80 µl SDS Probenpuffer und 30 mM DTT aufgenommen und die Probe 5 min bei 95°C erhitzt. Im Anschluss konnte die gelelektrophoretische Auftrennung folgen (siehe 3. 2. 3. 5).

3. 2. 3. 3 Kalter osmotischer Schock

Der kalte osmotische Schock nach Neu und Heppel (1964) wurde durchgeführt um periplasmatisches Extrakt für die SDS-PAGE zu gewinnen.

50 ml der gewünschten Kultur wurden bei 4000 x g für 10 min abzentrifugiert und die geernteten Bakterien mit 5 ml Puffer I gewaschen. Das gewonnene Pellet wurde in 2,5 ml Puffer II resuspendiert, unter Rühren langsam mit 2,5 ml Puffer III versetzt und für weitere 15 min kontinuierlich gemischt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (4000 x g, 20 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zügig in 2,5 ml eiskaltem Puffer IV resuspendiert, 10 min auf Eis gerührt und schließlich bei 4000 x g und 4°C für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand, welcher die periplasmatischen Bestandteile enthält, wurde abgenommen und zur Reinigung nochmals zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquots bei -80°C gelagert.

Puffer I

10 mM Tris-HCl, pH 7.3

30 mM NaCl

Puffer II

30 mM Tris-HCl, pH 7.3

Puffer III

40 % Saccharose in
30 mM Tris-HCl, pH 7.3
0,5 mM EDTA

Puffer IV

0,5 mM MgCl₂

3. 2. 3. 4 Membranpräparation

Die im Folgenden beschriebene Präparation wurde zur Gewinnung von Innen- und Außenmembranproteinen durchgeführt.

50 ml Bakterienkultur wurden 10 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 40 ml 100 mM NaCl gewaschen und anschließend in 15 ml 10 mM HEPES, pH 7.4 resuspendiert. Nach der Zugabe von DNase (1:1000) wurden die Proben über den Mikrofluidizer aufgeschlossen. Ein sich daran anschließender Zentrifugationsschritt (10 min bei 16000 x g) sollte Zelltrümmer entfernen. Der verbleibende Überstand wurde bei 120000 x g für 45 min und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 2 ml 10 mM HEPES, pH 7.4 resuspendiert, mit 40 µl Sarcosyl gemischt und über Nacht bei 4°C gerührt.

Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt von 45 min bei 120000 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen (Innenmembranfraktion), und das Pellet (Außenmembranfraktion) mit 3 ml 10 mM HEPES, pH 7.4 gewaschen. Die pelletierten Außenmembranproteine wurden schließlich in 200 µl 10 mM HEPES, pH 7.4 aufgenommen und, wie die Innenmembranfraktion, bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3. 2. 3. 5 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Das Sammelgel beinhaltete 6 % Acrylamid, die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels variierte je nach Probe zwischen 10 % und 15 %. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 V.

Die Visualisierung der entstandenen Proteinbanden erfolgte je nach Versuchsziel entweder durch Coomassiefärbung (siehe 3. 2. 3. 6) oder Western Blot (siehe 3. 2. 3. 7) mit anschließender Immundetektion.

SDS-Trenngelpuffer

1,5 mM Tris-HCl, pH 8.8

0,4 % (w/v) SDS

SDS-Sammelgelpuffer

0,5 mM Tris-HCl, pH 6.8

0,4 % (w/v) SDS

10x SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer

333 mM Tris-HCl

1 % (w/v) SDS

1,92 M Glycin

4x SDS-Probenpuffer

0,2 M Tris-HCl, pH 6.8

8 % (w/v) SDS

40 % (v/v) Glycerin

0,04 % (w/v) Bromphenolblau

30 mM DTT

Acrylamid

30% Rotiphorese Gel

3. 2. 3. 6 Coomassie-Färbung

Das zu färbende Gel wurde 30 s in Lösung A in der Mikrowelle erhitzt (400 W), 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und jeweils weitere 30 s in Lösung B und C aufgekocht. Abschließend wurde das Gel in Lösung D bis zum gewünschten Entfärbegrad geschwenkt.

Lösung A

25 % Isopropanol

10 % Essigsäure, (v/v)

0,05 % Coomassie Blau R-250, (w/v)

Lösung B

10 % Isopropanol

10 % Essigsäure, (v/v)

0,005 % Coomassie Blau R-250, (w/v)

Lösung C

10 % Essigsäure, (v/v)

0,002 % Coomassie Blau R-250, (w/v)

Lösung D

10 % Essigsäure, (v/v)

3. 2. 3. 7 Western-Blot

Nach der Auftrennung über die SDS-PAGE wurden die Proteine im Elektrophoret-Verfahren (*Semi-Dry*) mit dem Trans-Blot SD von Biorad entsprechend den Herstellerangaben auf eine PVDF-Membran (Amersham) übertragen.

Transferpuffer

15 mM Tris-HCl, pH 8.3

120 mM Glycin

0,2 % (w/v) SDS

20 % (v/v) Methanol

3. 2. 3. 8 Immundetektion von Proteinen

Zum Nachweis spezifischer Proteinbanden anschließend an den Western Blot wurde die PVDF-Membran für 1 h in Blockierlösung geschüttelt. Auf die einstündige Inkubation der Membran mit dem entsprechenden Erstantikörper folgten drei Waschschrte (je 5 min) in TBS-T. Der AP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde ebenfalls für eine Stunde appliziert und durch zweimaliges Waschen (je 5 min) in TBS-T wieder entfernt. Die Detektion der Proteinbande erfolgte durch die enzymatische Umwandlung der AP-Substrate BCIP und NBT in blaue Farbstoffe.

TBS-T

30 mM Tris, pH 7.5

150 mM NaCl

0,05 % Tween20

AP-Puffer

100 mM Tris, pH 9.5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂Färbereagenz

10 ml AP-Puffer

66 µl NBT (50 ng/ml in 70 % Dimethylformamid)

33 µl BCIP (50 ng/ml in 100 % DMF)

3. 2. 3. 9 Gentle Lysis-Western Blot

Zur Detektion unterschiedlicher Faltungsintermediate von trimeren Außenmembranproteinen in Gesamtzellextrakt wurde die „sanfte Lyse“ nach Ureta (2007) angewandt.

Hierfür wurden 5×10^8 Bakterienzellen einer Übernachtskultur abzentrifugiert, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Das Pellet wurde in 50 µl Lysepuffer A resuspendiert, erneut eingefroren und wieder aufgetaut. Nach

einem weiteren Tiefkühl- und Auftau-Schritt wurde der Probe DNase (Endkonzentration 0,5 mg/ml) zugegeben. Das Gemisch wurde 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 50 µl Lysepuffer B vermischt. Nach einem Inkubationsschritt bei Raumtemperatur (5 min) wurden die Proben mit Ladepuffer versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Auftrennung der Proben erfolgte über 10 % SDS-Gele bei 50 V.

Lysepuffer A

20 mM Tris-HCl, pH 7.5

1 mM EDTA

0,5 mg/ml Lysozym

Lysepuffer B

4 % SDS

20 mM EDTA

20 mM Tris-HCl, pH 7.5

Ladepuffer

2 % SDS

0,01 % Bromphenol

10 % Glycerol

5 % Mercaptoethanol

in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)

3. 2. 3. 10 Reinigung von Tsp mit His-Tag

Anzucht des Überexpressionsstamms DH5α

6 l NZA-Medium wurden mit Hilfe der üN-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 bei 37°C, 180 rpm inkubiert. Die Kultur wurde mit 100 µM IPTG induziert und daraufhin 1 h bei 28°C mit 180 rpm geschüttelt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (6000 g, 4°C, 15 min) sedimentiert und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Präparativer Aufschluss von Bakterienzellen

Die sedimentierten Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und in kaltem LEW-Puffer resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte am Mikrofluidizer M-110L bei einem Druck von 12 bar.

Reinigung über Ni-TED- und Ni-NTA-Säulen

Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (16000 x g, 30 min, 4°C) sedimentiert. Das geklärte Lysat wurde auf mit LEW-Puffer äquilibrierte Ni-TED-Säulen aufgetragen. Alle weiteren Reinigungsschritte können dem Abschnitt 4. 5. 1 entnommen werden.

LEW-Puffer

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

pH 8.0

3. 2. 3. 11 Aktivitätstest mit einem pNA-Peptid

Die proteolytische Aktivität von Proteasen kann durch Peptide bestimmt werden, die eine C-terminal gekoppelte p-Nitroanilin-Gruppe (pNA) besitzen. Die Spaltung des Substrats durch die Protease muss hierfür zwischen der p-Nitroanilin-Gruppe und der damit verknüpften Aminosäure erfolgen. Die Menge des freigesetzten p-Nitroanilin ist ein Maß für die Proteaseaktivität und kann photometrisch quantifiziert werden. Für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität von DegP und Tsp wurde das pNA-Peptid mit der AS-Sequenz DPMFKLV verwendet. Das Peptid wurde mit einer Endkonzentration von 0,5 mM eingesetzt und mit dem zu untersuchenden Protein vermischt. Der Ansatz wurde mit Reaktionspuffer (50mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8) auf 100 µl aufgefüllt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm kontinuierlich bei 37°C für 3 h gemessen. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten beruhen auf drei unabhängigen Doppelbestimmungen.

Die spezifische Aktivität in mol/mg x min ergibt sich aus:

$$\frac{\Delta E_{405} \times Vol_{End}}{c \times \epsilon \times t}$$

ΔE_{405} : Extinktionsänderung bei 405 nm über den Messungszeitraum

Vol_{End} : Endvolumen des Reaktionsansatzes (ml)

c: Konzentration des zu untersuchenden Proteins im Reaktionsansatz (mg/ml)

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient des pNAs ($8.800 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

t: Messzeit in Minuten

3. 2. 3. 12 Abbau von Proteinen durch DegP und Tsp

Zur Untersuchung auf gemeinsame Substrate wurden DegP und Tsp mit verschiedenen Proteinen inkubiert. Durch SDS-PAGE (siehe 3. 2. 3. 5) und Coomassie-Blau Färbung (siehe 3. 2. 3. 6) konnte dann kontrolliert werden, welche Proteine von den Proteasen abgebaut wurden. 5 μg des zu untersuchenden Proteins werden mit 10 μg DegP bzw. Tsp in Reaktionspuffer (50mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8) gemischt und bei 37°C für 10 min bis 2 h inkubiert. Die Proben wurden dann mittels SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung untersucht.

3. 2. 3. 13 Herstellung und Inkubation von Peptidbibliotheken

Zur Selektion von Liganden der PDZ-Domäne von Tsp wurde mit Hilfe der SPOT-Synthese nach Boisguérin (2007) eine Peptidbibliothek erstellt. Dazu wurde eine Zellulosemembran (Whatman, 19 x 29 cm) verwendet, die nach der Peptidsynthese mit A. dest., Ethanol, TBS und abschließend mit Ethanol gewaschen wurde. Danach wurde die Membran getrocknet und bis zur Inkubation bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde die Membran in Ethanol (10 min) und anschließend in Waschpuffer (3 x 10 min) geschwenkt. Die Membran wurde daraufhin 3 h in Blockingreagenz (Sigma-Aldrich, München) und anschließend über Nacht bei 4°C in Blockingreagenz mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tsp inkubiert. Danach wurde die Membran in Waschpuffer geschwenkt (3 x 10 min), 20 min mit dem Erstantikörper (Rabbit-anti-Tsp, polyklonal 1:20000) inkubiert und erneut mit Puffer gewaschen (3 x 10 min). Nach der Inkubation mit dem Zweitkörper (Anti-rabbit IgG-HRP, Sigma, 1:4000) wurde die Membran nochmals gewaschen (3 x 10 min). Zur Detektion wurde das *West Pico Chemiluminescence Substrat*-Kit (Pierce Biotechnology) benutzt.

TBS

30 mM Tris-HCl, pH 7.5

150 mM NaCl

Waschpuffer

50 mM NaH_2PO_4 , pH 8.0

3. 2. 4 *In vivo* Experimente

3. 2. 4. 1 *Phenotype MicroArray*TM

Die *Microarray*-Analyse von Deletionsstämmen gibt Aufschluss über die physiologischen Auswirkungen der genetischen Veränderung, indem sie die zeitgleiche Untersuchung einer Vielzahl von Phänotypen ermöglicht. PM-Tests werden in 96-*well*-Mikrotiterplatten durchgeführt, die unterschiedlichste Nährstoffe oder Inhibitoren beinhalten. Die Zellrespiration der zu untersuchenden Stämme wird in diesen Platten mit Hilfe eines Redox-Indikators kolorimetrisch gemessen. Bei dem Redox-Reporter handelt es sich um ein Tetrazoliumsalz, das in reduziertem Zustand violett ist. Unter physiologischen Bedingungen ist die Reduktion irreversibel, der Farbstoff akkumuliert in der Plattenvertiefung und verstärkt somit das Signal.

Laufen alle zellulären Prozesse normal, wächst die Zelle und Elektronen fließen von der Nährstoffquelle zu NADH und schließlich über die Elektronentransportkette der Zelle zum Tetrazoliumsalz, welches sich daraufhin violett verfärbt. Ist einer dieser Prozesse gestört, entwickelt sich nur wenig violetter Farbstoff, bei essentiellen Wachstumsschädigungen der Zelle bleibt der Farbumschlag ganz aus. Der OmniLog[®]-Inkubator misst den Farbumschlag, indem er die Mikroplatten vor eine CCD-Kamera fährt. Auf diese Weise werden quantitative und kinetische Informationen der Zellantwort erstellt (Bochner, 2001).

3. 2. 4. 2 *Spot-Test*

Das Wachstum der 84 Doppeldeletionsstämmen, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden (siehe Tabelle 3. 3), wurde unter verschiedenen Bedingungen getestet. Dazu wurde ein Tropfen (1000 Zellen) einer Übernachtskultur auf eine NZA-Agarplatte aufgebracht und bei 28°C - 43°C für 12 h inkubiert. Je nach Versuchsreihe wurde den Agarplatten 500 mM NaCl oder 0,5 % SDS und 0,5 mM EDTA zugesetzt. Das Aussehen und die Größe der entstandenen *Spots* wurden notiert.

4 Ergebnisse

4. 1 Identifizierung synthetischer Phänotypen

Bestimmte Kombinationen aus zwei Nullmutationen im Genom von *E. coli* können zu synthetischen Phänotypen führen. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer synthetischen genetischen Interaktion, die auf redundante Funktionen der entsprechenden Genprodukte hinweist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher die Herstellung verschiedener Doppel-*knockout*-Mutanten (Doppel-KO-Mutanten) bzw. die Identifizierung der resultierenden synthetisch letalen Phänotypen genutzt, um zentrale Faktoren der Proteinqualitätskontrolle zu erkennen und potentiellen Faltungswegen zuzuordnen. Zusätzlich sollte die Membranintegrität der Deletionsstämme überprüft werden, um weitere Zusammenhänge von Faltungsfaktoren bei der Biogenese wichtiger Membranproteine aufzudecken. Außerdem wurden alle Deletionsstämme morphologisch charakterisiert.

Tab. 4. 1: Periplasmatische Faltungsfaktoren

Chaperone	Oxidoreduktasen	Prolinisomerasen	Serinproteasen	Metalloproteasen
Skp	DsbA	FkpA	DegP	PtrA
	DsbC	PpiA	Tsp	YcaL
		PpiD	YdgD	YfgC
		SurA		YggG

4. 1. 1 Synthetische Phänotypen unter optimalen Wachstumsbedingungen

Nullmutationen von 14 verschiedenen Faltungsfaktoren und Proteasen (siehe Tab. 4. 1) wurden mittels P1-Transduktion (siehe 3. 2. 2. 4) von bereits vorhandenen KO-Stämmen (Laborsammlung AG Ehrmann) auf den Wildtypstamm BW30270 übertragen. Auf diese Weise wurden jeweils zwei Deletionen in verschiedenen Kombinationen zusammengeführt. Es entstanden 84 Doppel-KO-Stämme (siehe Tab. 3. 3) von denen drei unter optimalen Laborbedingungen (Vollmedium, 37°C) synthetisch letal waren. Wie bereits von Rizzitello (2001) beschrieben, erwiesen sich *surA skp* und *surA degP* als letale Kombinationen. Einen

bisher unbekannten synthetisch letalen Phänotyp zeigte der Deletionsstamm *surA tsp*. Er war auf NZA-Medium weder bei 37°C noch bei 28°C lebensfähig.

4. 1. 2 Synthetische Phänotypen unter Stressbedingungen

Hitzeschock und Hyperosmolarität im umgebenden Milieu sind typische Bedingungen, die Faltungsstress im Periplasma hervorrufen (Meccas, 1993; Jubelin, 2005). Zur Identifizierung weiterer Faltungsfaktoren mit redundanter Funktion wurden daher alle 81 Doppelmutanten, die unter optimalen Wachstumsbedingungen keine Auffälligkeiten zeigten, zusammen mit den 14 korrespondierenden Einzelmутanten unter diesen Stressbedingungen inkubiert. Hierfür wurden aus Flüssigkulturen jeweils 10^2 Zellen abgenommen und auf entsprechende Nährplatten aufgetropft.

4. 1. 2. 1 Erhöhte Temperatur

Die Überprüfung der Temperatursensitivität wurde auf NZA-Platten durchgeführt. Die aufgetropften Bakterien wurden über Nacht bei 43°C inkubiert und das Wachstum bestimmt. Nur ein Doppel-KO-Stamm konnte hierbei als synthetisch letal identifiziert werden (siehe Abb. 4. 1.).

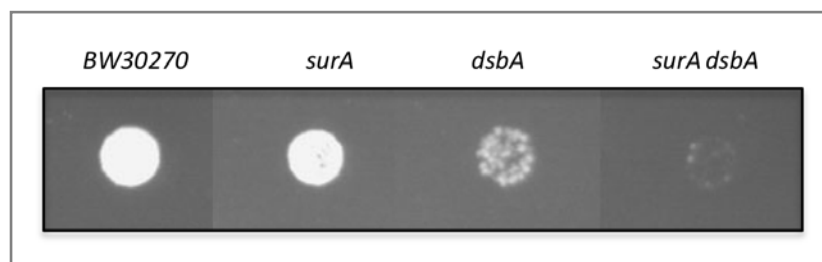


Abb. 4. 1: Wachstum des Deletionstamms *surA dsbA* bei 43°C. Wachstum des Doppel-KO-Stamms im Vergleich zum Wildtyp BW30270 und zu den entsprechenden Einzelmутanten. Angegeben ist immer der relevante Genotyp.

Die *surA*-Einzeldelentionsmutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp BW30270 ein kaum schwächeres Wachstum, wohingegen die *dsbA*-Deletionsmutante eine deutliche Temperatursensitivität aufweist. Synthetisch letal ist jedoch erst der kombinierte Genotyp *surA dsbA*, welcher weder die Prolinisomerase SurA noch die Oxidoreduktase DsbA exprimiert.

4. 1. 2. 2 Erhöhte Osmolarität

Hyperosmolares Medium wurde durch die Zugabe von 500 mM NaCl zu NZA-Platten hergestellt. Die aufgetropften Bakterien wurden über Nacht entweder bei 37°C oder 42°C inkubiert. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tab. 4. 2 dargestellt.

Tab. 4. 2: Wachstum von Deletionsstämmen unter hyperosmolaren Bedingungen. Aufgelistet sind nur Doppel-KO-Stämme bei denen ein sichtbarer Wachstumsdefekt im Vergleich zu den entsprechenden Einzelmутanten zu sehen war. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Der Wildtyp BW30270 diente als Maßstab zur Beurteilung des Wachstums. Alle Stämme die mit „+++“ gekennzeichnet sind, wuchsen genauso gut wie der Wildtyp, die Bezeichnung „++“ weist auf ein sichtbar schlechteres Wachstum hin. Mutanten, die nur wenige Kolonien ausbildeten, sind mit „+“, letale Phänotypen mit „-“ beschrieben.

Relevanter Genotyp	37°C	42°C
BW30270	+++	+++
<i>surA</i>	++	+
<i>ppiD</i>	+++	+++
<i>fkpA</i>	+++	+++
<i>dsbA</i>	++	+
<i>degP</i>	+++	+++
<i>tsp</i>	++	+
<i>ptrA</i>	+++	+++
<i>yfgC</i>	+++	+++
<i>surA ptrA</i>	++	-
<i>surA yfgC</i>	++	-
<i>tsp ppiD</i>	++	-
<i>degP ppiD</i>	++	-
<i>degP tsp</i>	++	-
<i>dsbA degP</i>	++	-
<i>dsbA fkpA</i>	++	-

Das Wachstum unter hyperosmolaren Bedingungen bei 37°C ist bei allen aufgeführten Deletionsmutanten nicht bzw. nur leicht vermindert. Bei 42°C wachsen die *surA*-, *dsbA*- und *tsp*-Einzelmутanten in hyperosmolarem Medium deutlich schlechter als der Wildtypstamm.

Betrachtet man die unter diesen Bedingungen auffälligen Doppel-KO-Stämme, fallen erwartungsgemäß ebenfalls die *surA*-, *dsbA*- und *tsp*-Deletionen auf. So erweisen sich die Stämme, die weder die Prolinisomerase SurA noch die Metalloproteasen PtrA bzw. YfgC exprimieren, als synthetisch letal. Auch das Fehlen der Serinprotease Tsp und der Prolinisomerase PpiD bzw. der Serinprotease DegP führen zu letalen Phänotypen. DegP scheint ebenfalls im Zusammenhang mit der Prolinisomerase PpiD relevant zu sein und darüber hinaus redundante Funktionen mit der Oxidoreduktase DsbA zu besitzen, denn die Deletionsstämme *degP ppiD* und *dsbA degP* sind unter den getesteten Bedingungen synthetisch letal. Der Phänotyp des Deletionsstamms *dsbA fkpA* weist zudem auf eine mögliche redundante Funktion von DsbA mit der Prolinisomerase FkpA hin.

4. 1. 3 Membranintegrität der Deletionsmutanten

Die Außenmembran fungiert als selektive Abgrenzung zur Umwelt und bewahrt das Bakterium vor schädlichen Einflüssen. Ist die Membranintegrität jedoch gestört, zeigt sich das in der erhöhten Sensitivität der Bakterien gegenüber toxischen Stoffen, wie z. B. Detergenzien. Bei schweren Defekten können sogar intakte periplasmatische Proteine ins umgebende Milieu gelangen (Anderson, 1979). Da periplasmatische Chaperone, Faltungskatalysatoren und Proteasen an der Biogenese von Membranproteinen beteiligt sind, sollten weitere Redundanzen der Faltungsfaktoren durch die Charakterisierung von Membrandefekten identifiziert werden. Daher wurde die Sensitivität aller 81 Deletionsstämme gegenüber Detergenzien untersucht und die β -Galaktosidase-Aktivität im Kulturüberstand der Mutanten als Indikator für die Membranintegrität herangezogen.

4. 1. 3. 1 Sensitivität gegenüber Detergenzien

Zur Überprüfung der Sensitivität gegenüber Detergenzien wurde das Wachstum aller Deletionsstämme auf NZA-Platten mit 0,5 mM EDTA und 0,5 % SDS bestimmt. Die aufgetropften Bakterien wurden über Nacht entweder bei 37°C oder 42°C inkubiert. In Tab. 4. 3 sind nur Doppel-KO-Stämme aufgelistet, die einen sichtbaren Wachstumsdefekt im Vergleich zu den entsprechenden Einzelmutanten aufwiesen. Die Kennzeichnung der Phänotypen erfolgte wie in Tab. 4. 2.

Tab. 4. 3: Wachstum von Deletionsstämmen auf NZA-Medium, versetzt mit 0,5 mM EDTA und 0,5 % SDS. Aufgelistet sind nur Doppel-KO-Stämme bei denen ein sichtbarer Wachstumsdefekt im Vergleich zu den entsprechenden Einzelmутanten zu sehen war. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Die Kennzeichnung der Phänotypen erfolgte wie in Tab. 4. 2.

Relevanter Genotyp	37°C	42°C
BW30270	+++	+++
<i>dsbA</i>	+	+
<i>degP</i>	+	-
<i>tsp</i>	+	+
<i>ydgD</i>	+++	+++
<i>yfgC</i>	+++	+++
<i>dsbA degP</i>	-	-
<i>degP yfgC</i>	-	-
<i>degP tsp</i>	-	-
<i>tsp ydgD</i>	-	-

Wie schon unter hyperosmolaren Bedingungen zeigen auch hier die *dsbA*- und *tsp*-Einzeldelentionsmutanten einen deutlichen Wachstumsdefekt. Zusätzlich ist der *degP*-Einzeldelentionsmutant sensitiv gegenüber den eingesetzten Detergenzien. Alle auffälligen Doppelmутanten bilden ihren Phänotyp schon bei 37°C aus. Hierbei ist interessant, dass zwar erneut *dsbA*- und *tsp*-Doppeldelentionsmutanten letal sind, es sich aber bei drei von den vier nicht lebensfähigen Stämmen um Kombinationen mit *degP* handelt. Neben DegP sind auch die anderen relevanten Faktoren, mit Ausnahme der Oxidoreduktase DsbA, Proteasen. Anscheinend sind diese Proteasen für die Sensitivität gegenüber den eingesetzten Detergenzien von großer Bedeutung.

4. 1. 3. 2 Nachweis von cytoplasmatischer β -Galaktosidase im umgebenden Milieu

β -Galaktosidase katalysiert in *E. coli* die Hydrolyse von Laktose, unter optimalen Wachstumsbedingungen liegt das Enzym ausschließlich im Cytoplasma vor. Auch die Klonierung hinter eine periplasmatische Signalsequenz führt nicht dazu, dass β -Galaktosidase die Innenmembran passieren kann (Lee et al., 1989). Bei Hitzestress ab 42°C findet man jedoch zunehmende Mengen an β -Galaktosidase auch im Periplasma. Dort sammelt sich das Protein an, denn aufgrund seiner Größe gelangt es nicht durch die Poren der Außenmembran in das umgebende Medium (Umakoshi, 1998). Das Vorliegen von β -Galaktosidase im Überstand von Bakterienkulturen weist demnach auf schwere Defekte von Innen- und Außenmembran der untersuchten Stämme hin.

Für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde NZA-Medium mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stamms angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 bei 37°C inkubiert. Zur ausreichenden Induktion der β -Galaktosidase-Expression wurden der Kultur zuvor 50 μ M IPTG zugegeben. In den Aktivitätstest wurden 50 μ l geklärtes Kulturmedium eingesetzt und die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität unter Berücksichtigung der exakten OD₆₀₀ jeder einzelnen Mutante in mmol/min x ml ermittelt (siehe 3. 2. 3. 1). In den Abb. 4. 2 bis 4. 4 sind Doppelmutanten dargestellt, die im Vergleich zu den entsprechenden Einzelmutanten eine deutlich erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität im Kulturüberstand aufwiesen oder in vorhergehenden Versuchen (siehe 4. 1. 2) bereits auffällig waren.

***β*-Galaktosidase-Assay von *dsbA*-Deletionsstämmen**

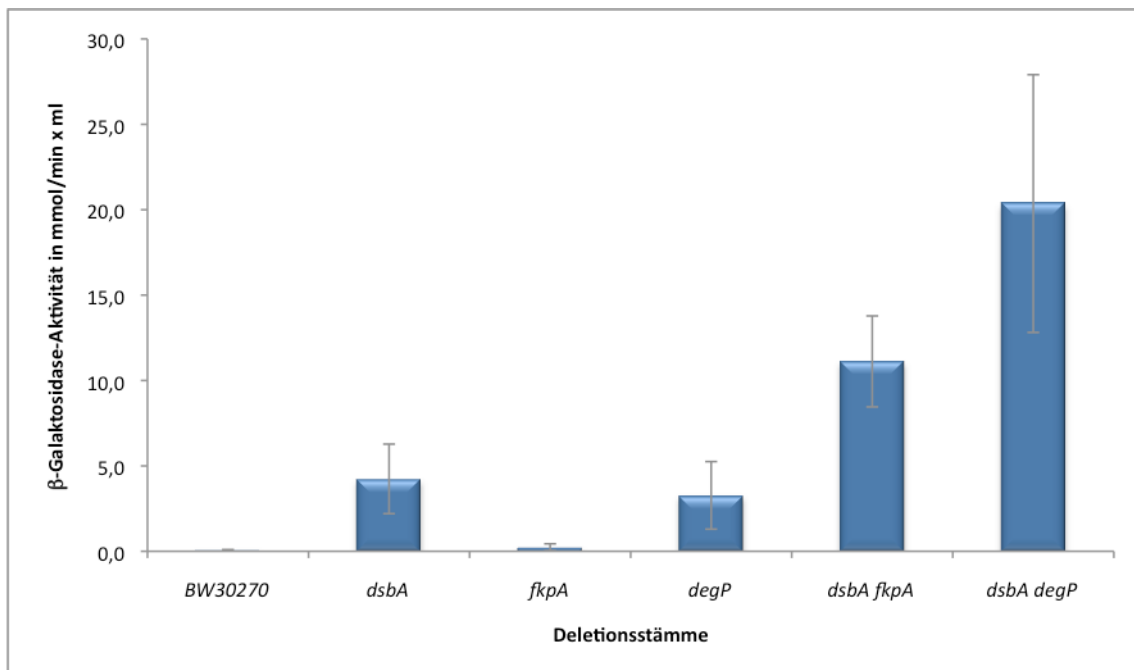


Abb. 4. 2: Spezifische β -Galaktosidase-Aktivität im Kulturüberstand von *dsbA*-Doppelmutanten. Die entsprechenden Einzelmутanten sind zum Vergleich aufgeführt. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Die Standardabweichung ist gezeigt, aber nicht beschrieben.

Im Kulturüberstand des Wildtypstamms BW30270 konnte erwartungsgemäß keine β -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden. Bei den Einzeldelentionsmutanten *dsbA* und *degP* hingegen gelangt β -Galaktosidase in das Medium. Mit Werten von 4,2 bzw. 3,3 mmol/min x ml ist die Aktivität jedoch geringer als bei den Doppeldeletionsmutanten *dsbA fkpA* und *dsbA degP*, die mit Werten von 11,1 und 20,4 mmol/min x ml eine deutlich höhere β -Galaktosidase-Konzentration im Medium aufweisen.

***β*-Galaktosidase-Assay von *degP*-Deletionsstämmen**

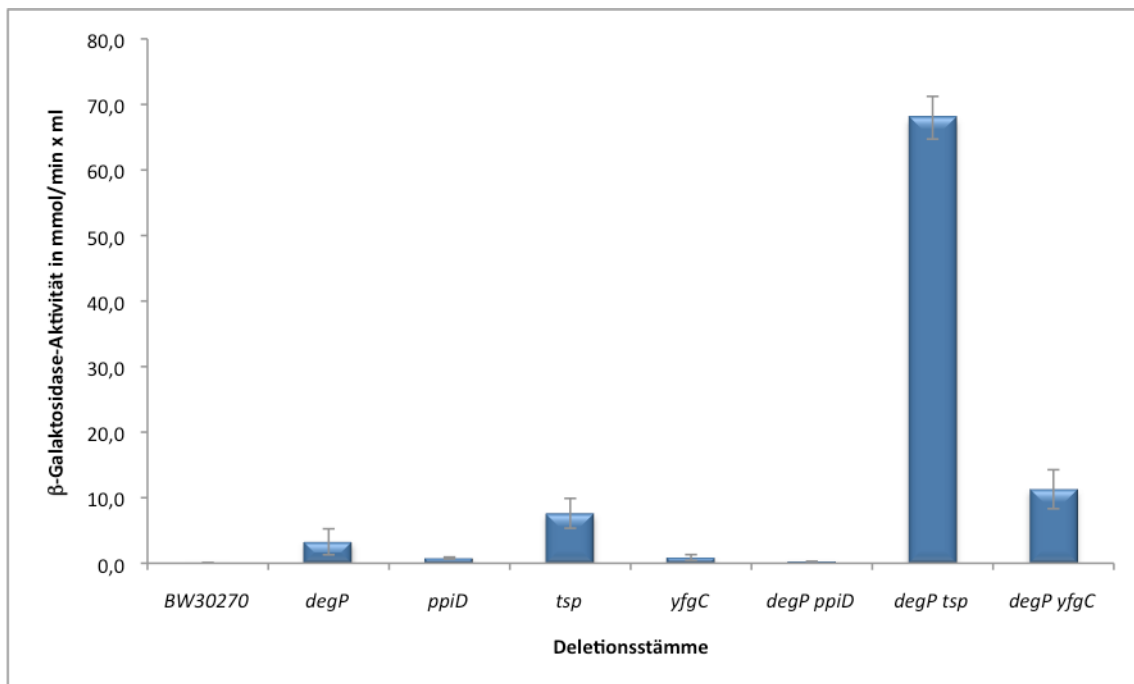


Abb. 4. 3: Spezifische *β*-Galaktosidase-Aktivität im Kulturüberstand von *degP*-Doppelmutanten. Die entsprechenden Einzelmутanten sind zum Vergleich aufgeführt. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Die Standardabweichung ist gezeigt, aber nicht beschrieben.

Unter den in Abb. 4. 3 aufgeführten Einzelmутanten fällt neben dem *degP*- der *tsp*-Deletionsstamm auf. Mit einem Wert von 7,6 mmol/min x ml ist seine *β*-Galaktosidase-Aktivität mehr als doppelt so hoch wie die des *degP*-KO-Stamms. Kombiniert man diese beiden Deletionen, erhöht sich die *β*-Galaktosidase-Aktivität sogar auf 68,0 mmol/min x ml. Mit 11,3 mmol/min x ml ist die *β*-Galaktosidase-Aktivität in der *degP yfgC*-Deletionsmutante fast identisch mit der des oben beschriebenen *dsbA fkpA*-KO-Stamms. Trotz der Deletion von *degP* gelangt keine *β*-Galaktosidase in das Kulturmedium des *degP ppiD*-KO-Stamms.

***β*-Galaktosidase-Assay von *tsp*-Deletionsstämmen**

Bei allen *tsp*-Doppeldeletionsmutanten konnte eine deutliche *β*-Galaktosidase-Aktivität gemessen werden (siehe Abb. 4. 4). Im Vergleich zur *tsp*-Einzeldelentionsmutante zeigt der *tsp ppiD*-KO-Stamm nur eine leichte Zunahme der Enzymmenge im Kulturüberstand. Bei den Deletionsstämmen *tsp fkpA* und *tsp ydgD* steigert sich die Aktivität jedoch annähernd um

den Faktor 3 auf 24,2 bzw. 22,4 mmol/min x ml, bei der in Abb. 4. 3 aufgeführten *degP tsp*-Deletionsmutante sogar um den Faktor 9.

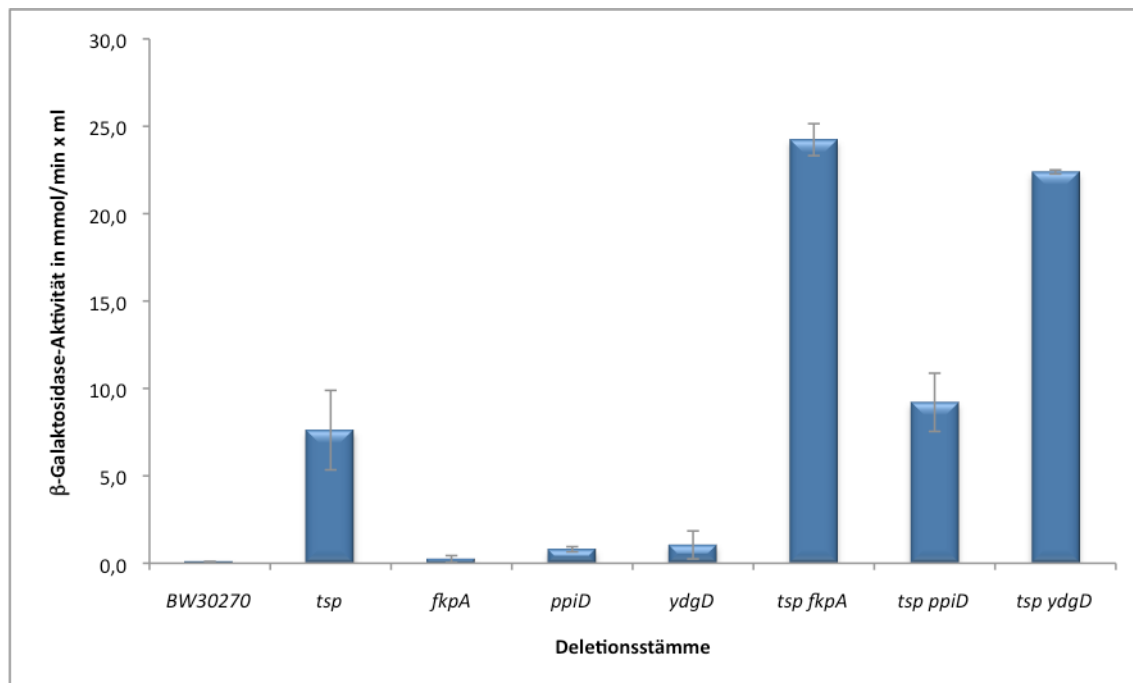


Abb. 4. 4: Spezifische β -Galaktosidase-Aktivität im Kulturüberstand von *tsp*-Doppelmutanten. Die entsprechenden Einzelmutanten sind zum Vergleich aufgeführt. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Die Standardabweichung ist gezeigt, aber nicht beschrieben.

β -Galaktosidase-Assay von *surA*-Deletionsstämmen

Bei keiner der *surA*-Doppelmutanten konnte in der untersuchten Wachstumsphase aktive β -Galaktosidase im Überstand festgestellt werden. Die *surA*-Einzelmutante zeigte hingegen eine deutliche Aktivität von 33,1 (\pm 1,7) mmol/min x ml.

Dieser Versuchsteil bestätigt die Ergebnisse aus Abschnitt 4. 1. 3. 1, die eine defekte Außenmembran für die Deletionsstämme *dsbA degP*, *degP tsp*, *degP yfgC* und *tsp ydgD* nahe legen. Darüber hinaus konnten durch die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität im Kulturüberstand von Deletionsmutanten zwei weitere Stämme mit gestörter Membranintegrität (*dsbA fkpA*, *tsp fkpA*) identifiziert werden.

4. 1. 4 Morphologische Charakterisierung aller Deletionsstämme

Morphologische Veränderungen der Bakterienzelle können u. a. auf Defekte in der Zellteilung oder der Außenmembran hindeuten (Hasman, 1999). Die Auswirkungen von

Deletionen in Faltungsfaktoren auf die Bakterienmorphologie sollte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft werden. Für diesen Versuchsteil wurden Verdünnungsausstriche auf NZA-Platten hergestellt, die über Nacht bei 37°C und 42°C inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Einzelkolonien auf morphologische Besonderheiten untersucht. Die beiden auffälligen Phänotypen sind in Abb. 4. 5 dargestellt.

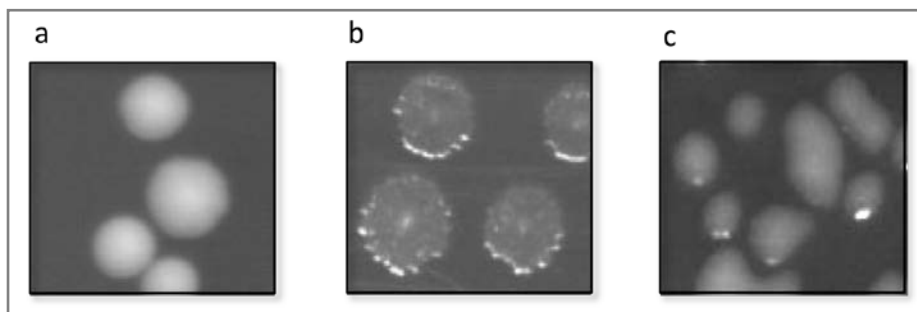


Abb. 4. 5: Kolonienmorphologie von Doppel-KO-Stämmen. **a** Kolonien des Wildtypstamms BW30270; **b** Kolonien der Deletionsmutante *surA yfgC* bei 42°C; **c** Kolonien der Deletionsmutante *degP tsp* bei 37°C

Im Vergleich zu den Kolonien des Kontrollstamms BW30270 zeigen die Kolonien der Deletionsmutante *surA yfgC* eine deutlich veränderte Morphologie bei erhöhten Temperaturen. Die Kolonien sind größer, ihr Rand ist gezackt und bis auf einen distinkten Bereich in der Mitte sind sie durchscheinend. Diese Form deutet daraufhin, dass sich nicht alle Zellen der Kolonie gleich schnell teilen. Die Kolonien des Doppel-KO-Stamms *degP tsp* sind bei 37°C insgesamt kleiner als die des Wildtyps und der entsprechenden Einzelmутanten. Außerdem ist anhand der auffälligen, glänzenden Oberfläche die Bildung von Schleimkapseln erkennbar, die normalerweise unter Stressbedingungen ausgebildet werden.

4. 2 Globale Charakterisierung synthetischer Phänotypen

In Abschnitt 4. 1 wurden synthetische Phänotypen für die Doppelmутanten *dsbA fkpA*, *dsbA degP*, *degP ppiD*, *degP yfgC*, *degP tsp*, *tsp ppiD*, *tsp fkpA*, *tsp ydgD*, *surA dsbA*, *surA ptrA* und *surA yfgC* beschrieben. Zur genaueren Charakterisierung dieser Phänotypen wurden *Phenotype Microarrays*TM durchgeführt und der Faltungsstress in diesen 11 Mutanten mittels qRT-PCR-Analyse charakterisiert.

4. 2. 1 Phenotype Microarrays™

Die *Phenotype Microarrays™* (PMs) wurden in Zusammenarbeit mit *Biolog, Inc.* durchgeführt (siehe 3. 2. 4. 1). Sie werden in 96-*well*-Mikrotiterplatten angesetzt, die unterschiedlichste Nährstoffe, Osmolyte und Toxine, wie Antibiotika und Detergenzien, beinhalten (siehe Abb. 4. 6 und Anhang). Die Zellrespiration der zu untersuchenden Stämme, die als Maß für die metabolische Zellaktivität genutzt wird, wird in diesen Platten mit Hilfe eines Redox-Indikators kolorimetrisch über einen Zeitraum von 24 - 48 h gemessen. Quantitative und kinetische Informationen über die Zellantwort werden in Abbildungen zusammengefasst, die in ihrer Aufteilung den Mikrotiterplatten entsprechen.

1 Kohlenstoff- quellen	2 Kohlenstoff- quellen	3 Stickstoff- quellen	4 Phosphor- und Schwefel- quellen	5 Nährstoffstoff- zusätze (z.B. Aminosäuren, Vitamine, etc.)
6 Stickstoff- Quellen (Peptide)	7 Stickstoff- Quellen (Peptide)	8 Stickstoff- Quellen (Peptide)	9 Osmolyte	10 pH-Werte
11	12	13	14	15
16	17	18	19	20

Abb. 4. 6: Aufteilung der PM-Abbildungen. Jedes der 20 Felder repräsentiert eine 96-*well*-Mikrotiterplatte

Um Unterschiede zwischen Kontrollstamm und Mutante deutlich zu erkennen, werden die Ergebnisse beider Stämme übereinandergelegt und Überlagerungen in gelb dargestellt. Folglich geben gelbe Kästchen an, dass die metabolischen Aktivitäten von Mutante und Wildtyp identisch sind. Ist die Aktivität der Mutante höher, ist das Kästchen grün, ist sie niedriger, ist das Kästchen rot (Bochner, 2001). Auf diese Weise kann zeitgleich eine Vielzahl von Phänotypen erkannt werden und potentielle Funktionen der ausgeschalteten Gene in physiologischen Prozessen werden aufgedeckt. Die fünf auffälligsten Doppel-KO-Stämme sind in den Abbildungen 4. 7 bis 4. 11 im Vergleich mit den entsprechenden Einzelmутanten dargestellt. Die verbleibenden sechs Doppelmutanten sind in Tab. 4. 4 zusammengefasst.

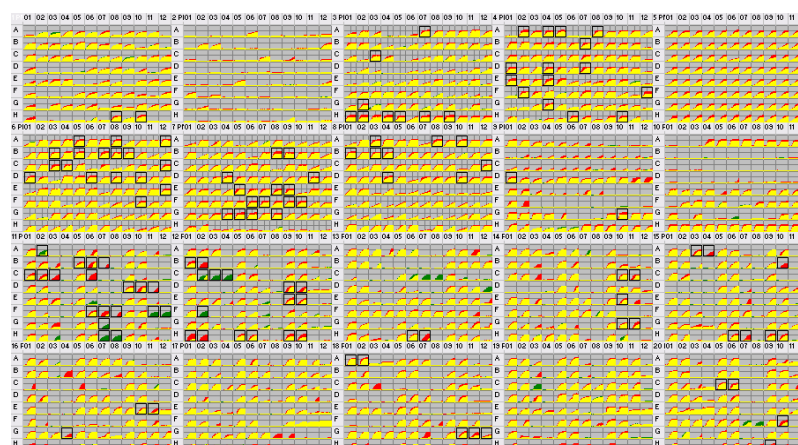
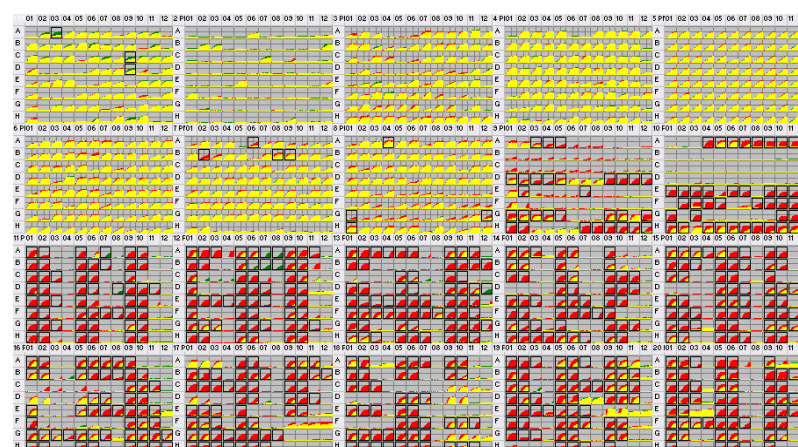
a) *degP*b) *dsbA*c) *degP dsbA*

Abb. 4. 7: PMs der Deletionsstämmen a) *degP*, b) *dsbA*, c) *degP dsbA* im Vergleich zum Wildtypstamm BW30270 bei 37°C

Jedes der 20 Felder repräsentiert eine 96-well-Mikrotiterplatte. Die oberste Reihe beinhaltet (von links) zwei Felder mit unterschiedlichen Kohlenstoff- und jeweils ein Feld mit Stickstoff-, Phosphor- bzw. Schwefelquellen und unterschiedlichen Nährstoffzusätzen. Die zweite Reihe beinhaltet (von links) drei Felder mit weiteren Stickstoffquellen, sowie jeweils ein Feld mit osmotischen und ionischen Zusätzen. Die unteren beiden Reihen enthalten unterschiedlichste Chemikalien (Detergenzien, Antibiotika, etc.). Jedes Kästchen entspricht einer Vertiefung der Mikrotiterplatte. Gelbe Kästchen geben an, dass die metabolischen Aktivitäten von Mutant und Wildtyp identisch sind. Ist die Aktivität der Mutante höher, ist das Kästchen grün, ist sie niedriger, ist das Kästchen rot.

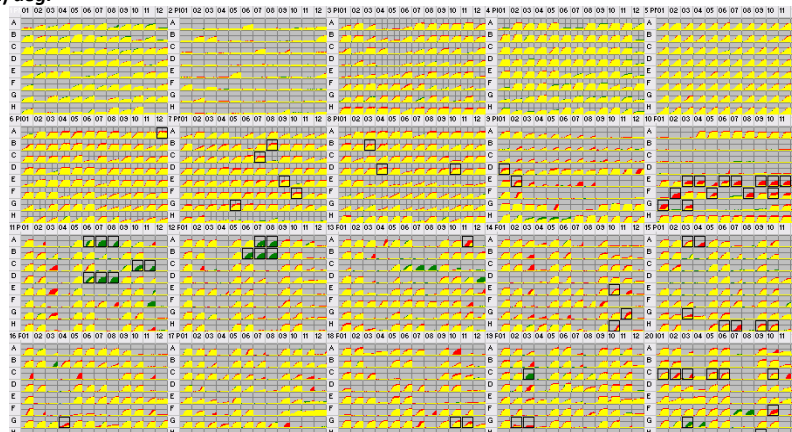
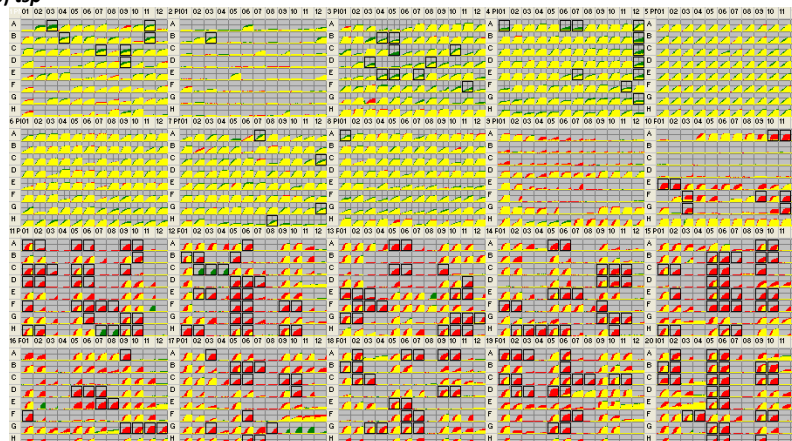
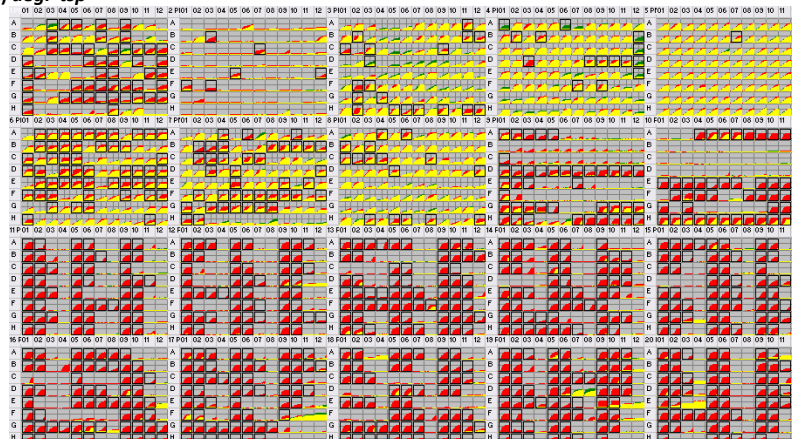
a) *degP*b) *tsp*c) *degP tsp*

Abb. 4. 8: PMs der Deletionsstämme a) *degP*, b) *tsp*, c) *degP tsp* im Vergleich zum Wildtypstamm BW30270 bei 37°C

Erläuterung zur Abbildung siehe Abb. 4. 7.

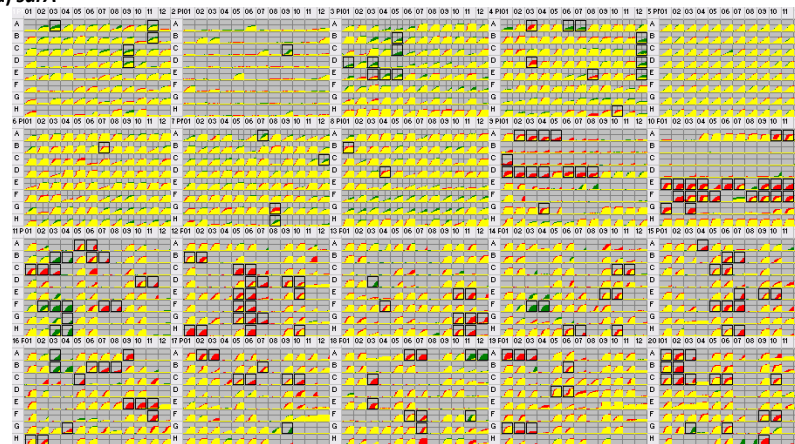
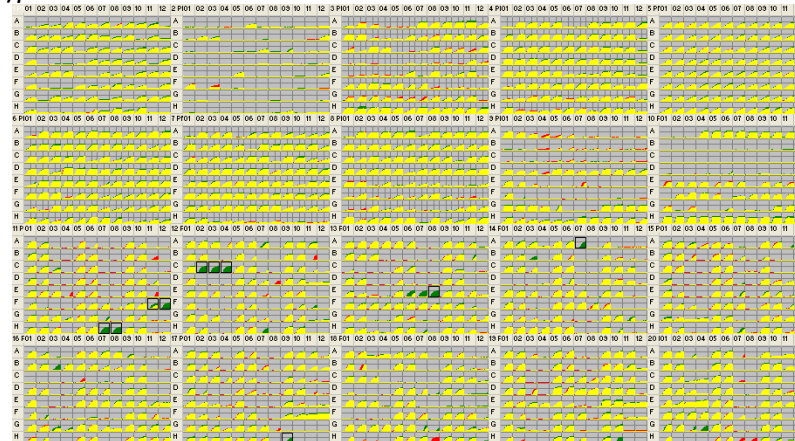
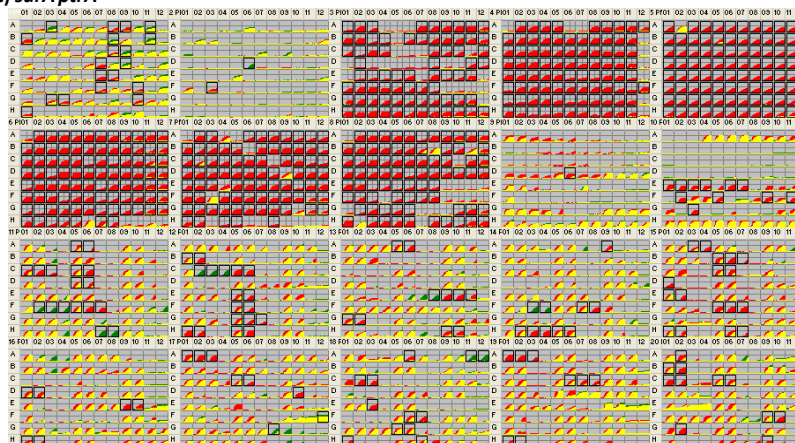
a) *surA*b) *ptrA*c) *surA ptrA*

Abb. 4. 9: PMs der Deletionsstämme a) *surA*, b) *ptrA*, c) *surA ptrA* im Vergleich zum Wildtypstamm BW30270 bei 37°C

Erläuterung zur Abbildung siehe Abb. 4. 7.

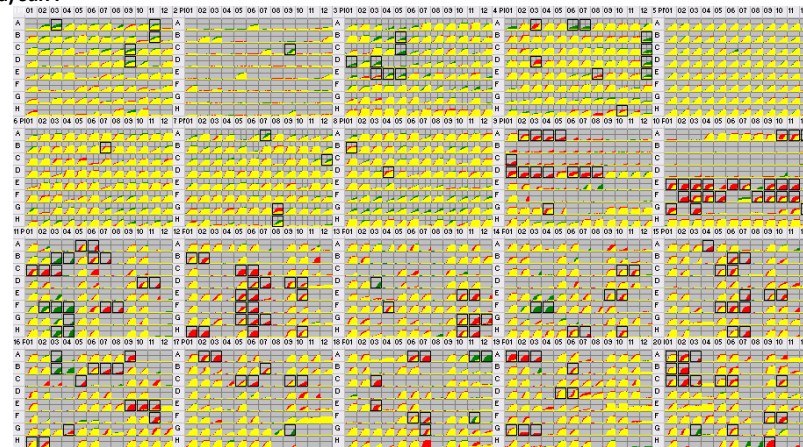
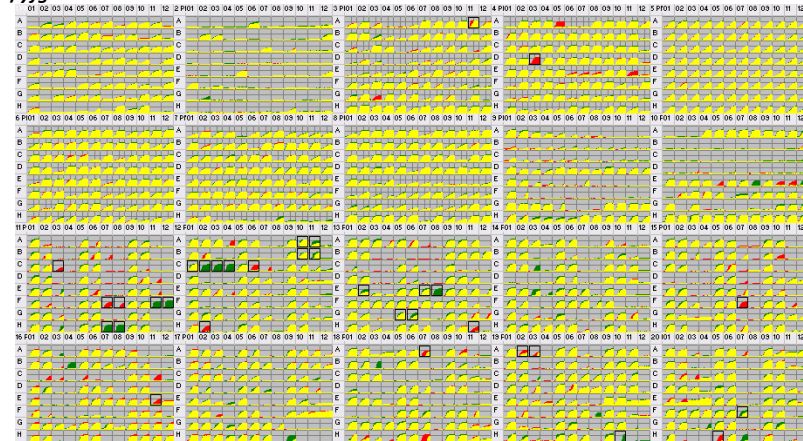
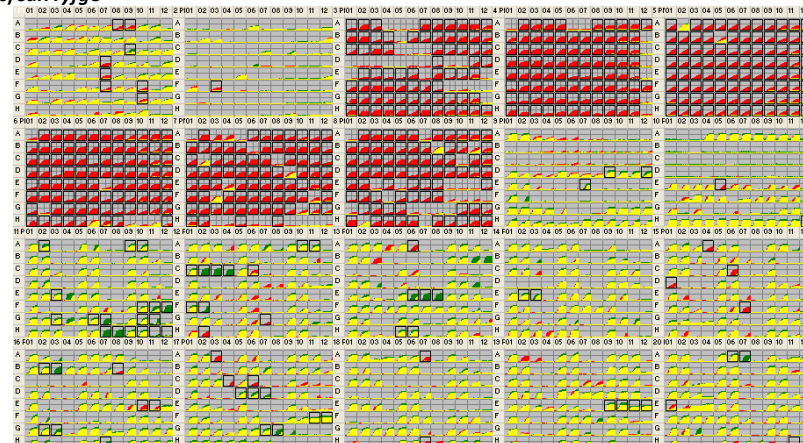
a) *surA*b) *yfgC*c) *surA yfgC*

Abb. 4. 10: PMs der Deletionsstämme a) *surA*, b) *yfgC*, c) *surA yfgC* im Vergleich zum Wildtypstamm BW30270 bei 37°C

Erläuterung zur Abbildung siehe Abb. 4. 7.

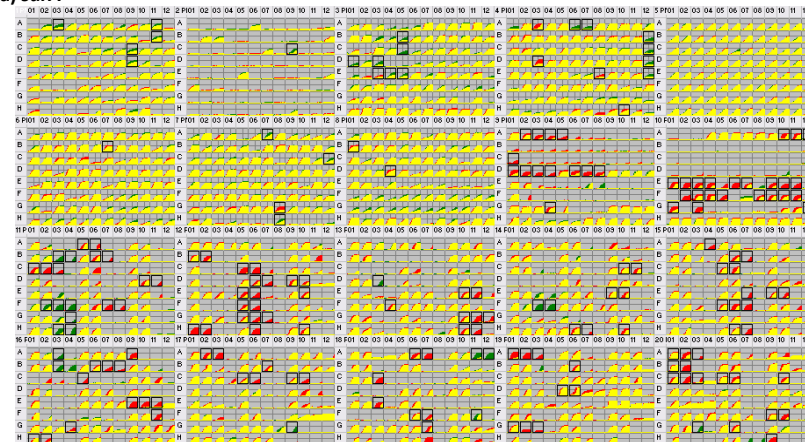
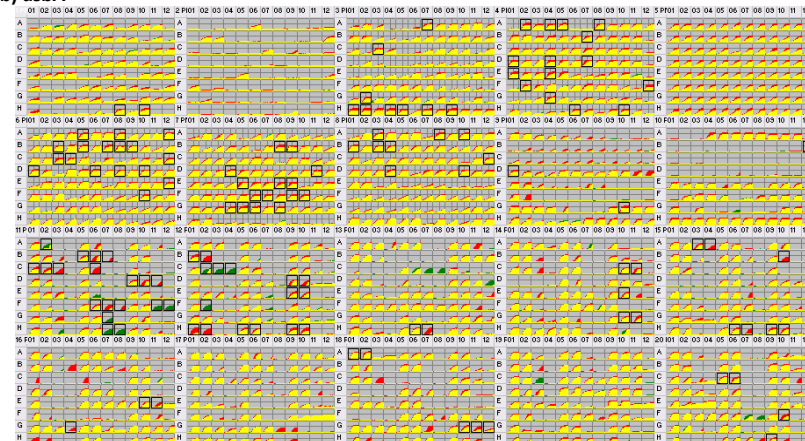
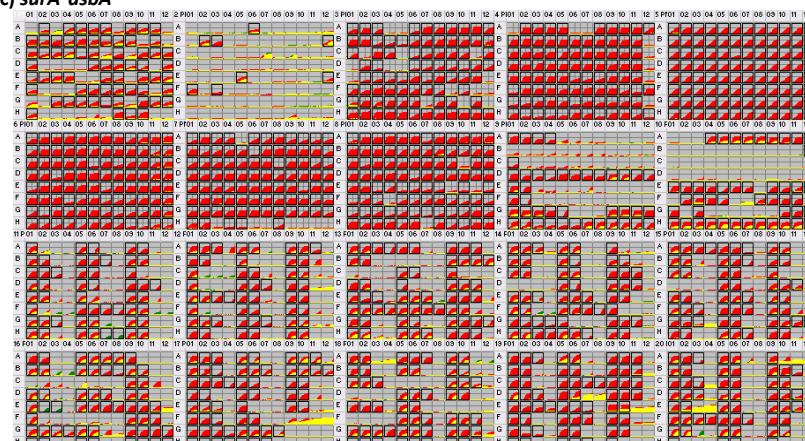
a) *surA*b) *dsbA*c) *surA dsbA*

Abb. 4. 11: PMs der Deletionsstämmen a) *surA*, b) *dsbA*, c) *surA dsbA* im Vergleich zum Wildtypstamm BW30270 bei 37°C

Erläuterung zur Abbildung siehe Abb. 4. 7.

degP-Doppelmutanten

Die *degP*-Einzeldeletionsmutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp BW30270 eine geringere metabolische Aktivität beim Wachstum in basischem Milieu und sie ist sensitiv gegenüber Osmolyten (KCl, Natriumformiat) und toxischen Ionen. Zudem kann die Mutante einige Dipeptide als Stickstoffquellen nicht metabolisieren. Die *dsbA*-Einzeldeletionsmutante hat unter allen Bedingungen einen langsameren Stoffwechsel als der Kontrollstamm, die Unterschiede sind jedoch nur gering. Stärkere Effekte zeigen sich, ähnlich der *degP*-Einzeldeletionsmutante, bei Dipeptiden als Stickstoffquellen und einigen Antibiotika aus der Gruppe der β -Lactame bzw. Macrolide (siehe Abb. 4. 7). Die *tsp*-Einzelmutante kann alle Nährstoffquellen umsetzen. Unter Einfluss einiger Chelatoren, Detergenzien und Antibiotika (hauptsächlich Macrolide bzw. Aminoglycoside), sowie in basischem Milieu ist ihre metabolische Aktivität jedoch deutlich reduziert (siehe Abb. 4. 8).

Die Kombination dieser Einzeldeletionen ergibt neue, stark ausgeprägte Phänotypen. Die *degP dsbA*-Doppelmutante weist schwerwiegende Defekte unter Bedingungen auf, die Faltungsstress auslösen (veränderter pH, erhöhte Osmolarität). Darüber hinaus deutet die verstärkte Sensitivität gegenüber zahlreichen Antibiotika, Detergenzien und anderen toxischen Stoffen auf Schäden in der Außenmembran hin (siehe Abb. 4. 7). Die *degP tsp*-Doppeldeletionsmutante verhält sich ähnlich (siehe Abb. 4. 8). Sie weist jedoch zusätzlich einen deutlich reduzierten Metabolismus bei Uridinphosphaten (Phosphorquelle), etlichen Kohlenstoffquellen und vor allem bei Dipeptiden als Stickstoffquellen auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei diesem Stamm auch allgemeine Prozesse, wie z. B. Transportvorgänge von Faltungsdefekten betroffen sind.

surA-Doppelmutanten

Die *surA*-Einzelmutante lässt keine allgemeinen Defekte beim Wachstum mit den verschiedenen Nährstoffquellen erkennen, dafür zeigt sie bei erhöhten Konzentrationen von KCl, NaCl und Na₂SO₄, sowie bei pH-Werten über 9 eine stark reduzierte metabolische Aktivität im Vergleich zum Kontrollstamm (siehe Abb. 4. 9). Außerdem reagiert die *surA*-Einzelmutante sensitiv auf einige Antibiotika (hauptsächlich Macrolide und β -Lactame). Die *ptrA*-Einzelmutante wächst hingegen unter allen getesteten Bedingungen wie der Wildtyp.

Die *yfgC*-Einzelmutante weist, abgesehen von ihrer Sensitivität gegenüber einigen β -Lactamen, ebenfalls einen normalen Phänotyp auf (siehe Abb. 4. 10).

Die genetische Kombination dieser Einzelmutanten verursacht in den Doppeldeletionsmutanten *surA ptrA* und *surA yfgC* deutliche Defekte. Sie können Stickstoff-, Phosphor- und Schwefelquellen nicht metabolisieren (siehe Abb. 4. 9 und Abb. 4. 10). Darüber hinaus zeigt die Deletionsmutante *surA ptrA* ein vermindertes Wachstum unter Einfluss von Detergenzien und einigen Antibiotika, wie z. B. Macroliden und Tetracyklinen. Der *surA dsbA*-KO-Stamm zeigt jedoch die auffälligsten Phänotypen. Seine Stoffwechselaktivität ist unter allen getesteten Bedingungen drastisch reduziert (siehe Abb. 4. 11). Die Ergebnisse der weiteren PMs sind in Tab. 4. 4 aufgelistet.

Tab. 4. 4: Kurzdarstellung weiterer PM-Tests. Die Einzelmutanten sind als Vergleichsmöglichkeit aufgeführt. „③“ bezeichnet überwiegend identische, „③“ leicht reduzierte und „③“ kaum metabolische Aktivität der entsprechenden Mutante im Vergleich zum Wildtyp BW30270. Angegeben ist immer der relevante Genotyp.

Rel. Genotyp	C-Quellen	N-Quellen	P-/S-Quellen	Nährstoffzusätze	Osmolyte	pH	Toxine
<i>ppiD</i>	③	③	③	③	③	③	③
<i>fkpA</i>	③	③	③	③	③	③	③
<i>dsbA</i>	③	③	③	③	③	③	③
<i>degP</i>	③	③	③	③	③	③	③
<i>tsp</i>	③	③	③	③	③	③	③
<i>ydgD</i>	③	③	③	③	③	③	③
<i>yfgC</i>	③	③	③	③	③	③	③
<i>dsbA fkpA</i>	③	③	③	③	③	③	③
<i>degP ppiD</i>	③	③	③	③	③	③	③
<i>degP yfgC</i>	③	③	③	③	③	③	③
<i>tsp ppiD</i>	③	③	③	③	③	③	③
<i>tsp fkpA</i>	③	③	③	③	③	③	③
<i>tsp ydgD</i>	③	③	③	③	③	③	③

Die *fkpA*-Einzeldelentionsmutante metabolisiert die unterschiedlichen Nährstoffquellen etwas langsamer als der Wildtyp, ansonsten ist sie ebenso unauffällig wie die *dsbA fkpA*-Doppeldelentionsmutante. Dieser Doppel-KO-Stamm weist kaum Unterschiede zu den entsprechenden Einzeldelentionen auf, zusätzliche Phänotypen sind vereinzelt unter den Toxinen zu finden.

Die beiden *degP*-Deletionsstämme *degP ppiD* und *degP yfgC* entwickeln ebenfalls keine ausgeprägten Phänotypen. Die *degP ppiD*-Doppel-KO-Mutante wächst unter erhöhten Salzkonzentrationen etwas schlechter als die *degP*-Einzeldelention. Ansonsten wächst dieser Stamm zum Teil aber besser als der Wildtyp. Die Phänotypen der *degP yfgC*-Doppeldelentionsmutante ähneln z. B. bei erhöhten pH-Werten dem *degP*-Einzel-KO-Stamm. Außer der Sensitivität gegenüber einigen Antibiotika zeigt sie ansonsten keine relevanten Unterschiede zu den entsprechenden Einzeldelentionen.

Die Phänotypen der *tsp*-Deletionsmutanten *tsp ppiD* und *tsp fkpA* gleichen deutlich der *tsp*-Einzelmutante, nur der *ydgD tsp*-KO-Stamm scheint unter toxischen Bedingungen insgesamt eine etwas niedrigere metabolische Aktivität zu besitzen.

4. 2. 2 Quantifizierung von Faltungsstress

Häufen sich fehlgefaltete Proteine in der Zellhülle an, wird der σ^E -abhängige Signalweg aktiviert, um das Überleben der Zelle zu sichern (Mecas, 1993). Die Expression von σ^E wird über einen positiven Rückkopplungsmechanismus gesteuert, indem σ^E die Transkription seines eigenen Gens (*rpoE*) reguliert (Rouvière, 1995). Die Menge an RNA, welche für *rpoE* codiert, ist somit ein Indikator für das Ausmaß an Faltungsstress in der Bakterienzelle. Neben dem σ^E -abhängigen Signalweg sind die Zweikomponentensysteme Cpx und Bae für die Stressantwort in der Zellhülle verantwortlich (Danese, 1998, Raffa, 2002). Die Expression von *spy* wird sowohl vom Cpx- als auch vom Bae-System hochreguliert (Price & Raivio, 2009). Die Menge an *spy*-RNA in der Bakterienzelle ist demzufolge ein weiterer Indikator für Faltungsstress.

Mittels qRT-PCR (siehe 3. 2. 1. 7) wurden die 11 Deletionsstämme untersucht, die in den vorhergehenden Versuchen synthetische Phänotypen zeigten (siehe Abschnitt 4. 1). Dafür wurden sie in M9-Minimalmedium bis zum Erreichen der Log-Phase bei 37°C inkubiert, aus

den Flüssigkulturen wurde RNA gewonnen (siehe 3. 2. 1. 5) und in cDNA umgeschrieben (siehe 3. 2. 1. 6). Die σ^E -Antwort wurde durch die Expressionsanalyse des Gens *rpoE* (σ^E) genauer untersucht, das Cpx- und Bae-regulierte Gen *spy* wurde für die Charakterisierung der beiden Zweikomponentensysteme herangezogen. Als Referenzgene, die später der Normalisierung dienten, wurden *gapA* und *aceE* ausgewählt. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sind in Abb. 4. 12 bis 4. 17 dargestellt.

4. 2. 2. 1 σ^E -Antwort in Deletionsmutanten

σ^E -Antwort in *dsbA*-Mutanten

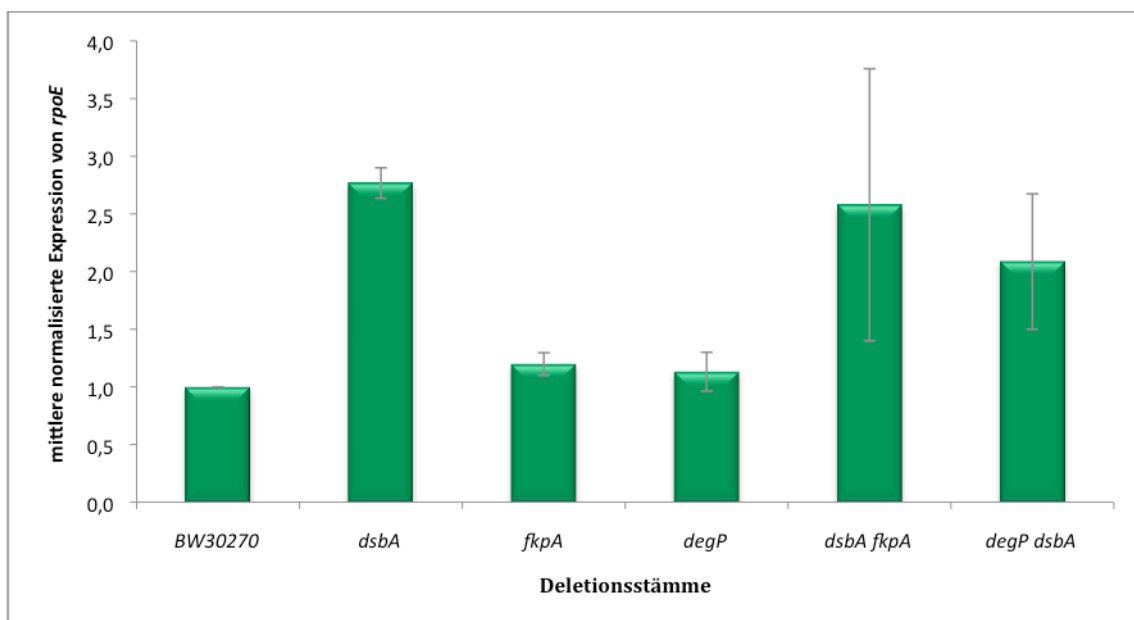


Abb. 4. 12: Relative *rpoE* Expression in *dsbA*-Doppelmutanten. Dargestellt ist die *rpoE* Expression verschiedener Doppelmutanten bezogen auf die Expression des Wildtyps BW30270. Die entsprechenden Einzelmutanten sind zum Vergleich aufgeführt. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Die Standardabweichung ist gezeigt, aber nicht beschrieben.

Die Deletion des Gens *dsbA*, welches für eine Oxidoreduktase codiert, wirkt sich im Gegensatz zu den *fkpA*- und *degP*-Mutationen, die im Vergleich zum Wildtyp keine Effekte zeigen, deutlich auf die Expression von *rpoE* aus. Die Erhöhung der Expression um das 2,8fache in der Einzelmutante und in den beiden entsprechenden Doppelmutanten um das 2,6 bzw. 2,1fache (*dsbA fkpA* bzw. *degP dsbA*) weisen eindeutig auf Faltungsdefekte in der

Zellhülle von *dsbA*-Einzelmutanten hin, die sich jedoch durch die Deletion weiterer Faktoren nicht verstärken (siehe Abb. 4. 12).

σ^F -Antwort in *degP*-Mutanten

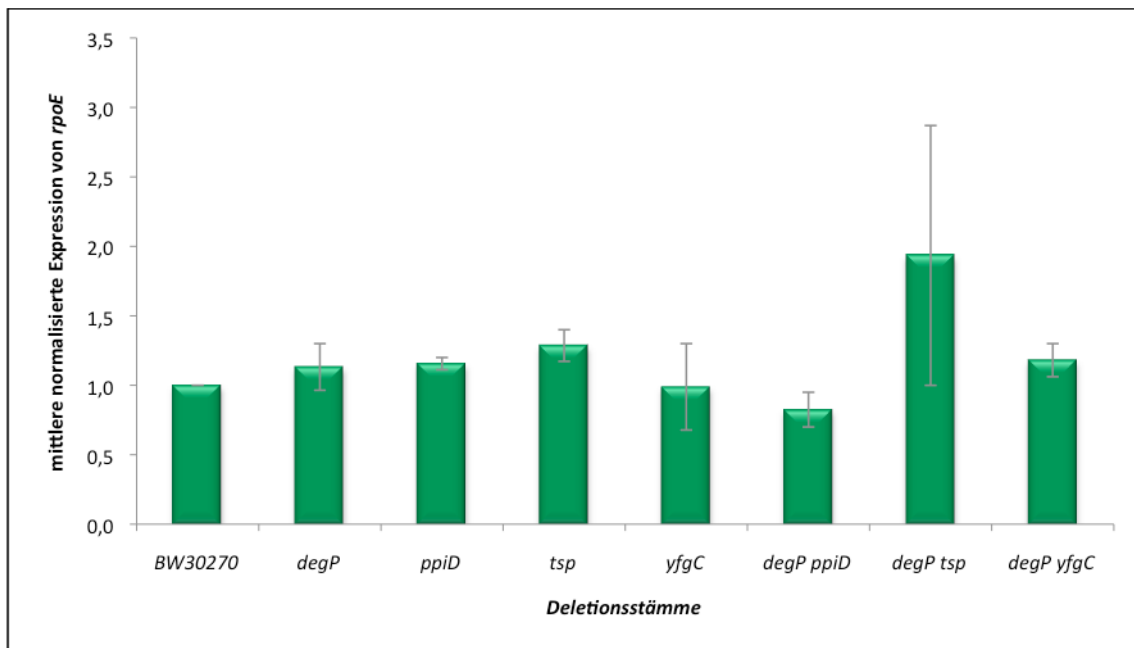


Abb. 4. 13: Relative *rpoE* Expression in *degP*-Doppelmutanten. Dargestellt ist die *rpoE* Expression verschiedener Doppelmutanten bezogen auf die Expression des Wildtyps BW30270. Die entsprechenden Einzelmutanten sind zum Vergleich aufgeführt. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Die Standardabweichung ist gezeigt, aber nicht beschrieben.

Die *rpoE* Expression der Einzelmutanten (siehe Abb. 4. 13) unterscheidet sich nicht signifikant von der des Kontrollstamms. Bei den *degP*-Doppelmutanten konnten ebenfalls keine Unterschiede beobachtet werden, mit Ausnahme des *degP tsp*-KO-Stamms. Kombiniert man die Deletion der Gene *degP* und *tsp*, welche beide für eine Serinprotease codieren, kommt es zu einer Verdopplung der *rpoE* Expression.

σ^F -Antwort in *tsp*-Mutanten

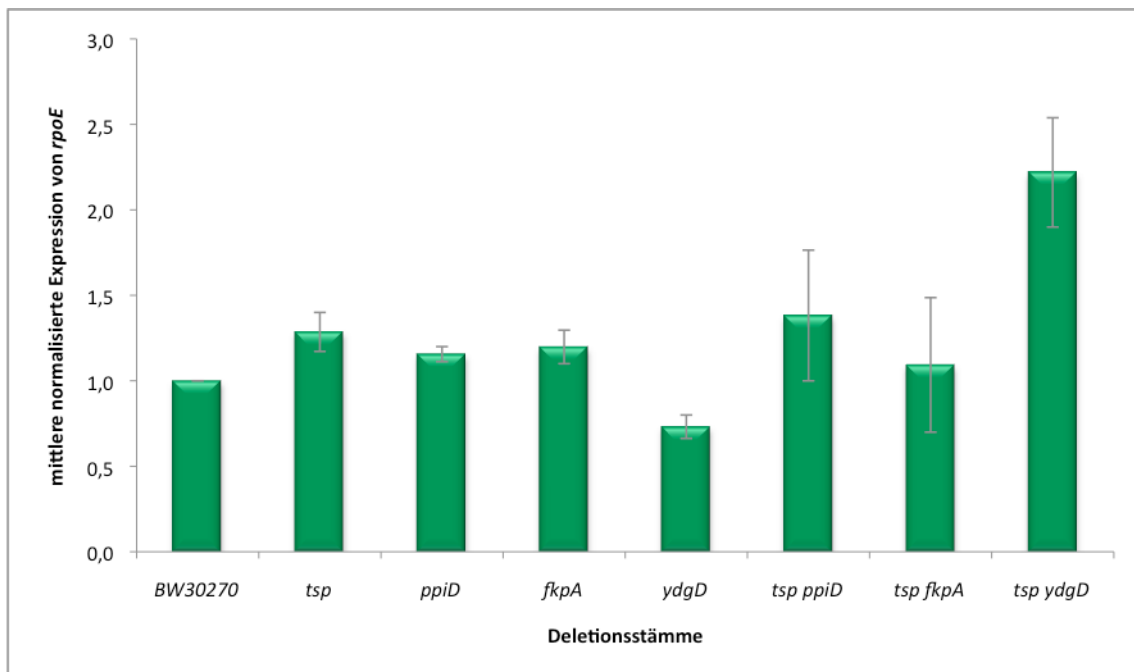


Abb. 4. 14: Relative *rpoE* Expression in *tsp*-Doppelmutanten. Dargestellt ist die *rpoE* Expression verschiedener Doppelmutanten bezogen auf die Expression des Wildtyps BW30270. Die entsprechenden Einzelmутanten sind zum Vergleich aufgeführt. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Die Standardabweichung ist gezeigt, aber nicht beschrieben.

Die σ^E -Antwort der dargestellten Stämme ist im Vergleich zum Wildtyp kaum erhöht (siehe Abb. 4. 14). Eine Ausnahme bildet die *tsp ydgD*-Deletionsmutante, ihre Expression ist um den Faktor 2,2 hochreguliert.

σ^F -Antwort in *surA*-Mutanten

Die *surA*-Einzelmутante, welche in keiner der Abbildungen dargestellt ist, zeigt mit einer Hochregulation um den Faktor 4,5 ($\pm 0,1$) im Vergleich zum Kontrollstamm die deutlichste Expressionsänderung. Daten von *surA*-Doppelmutanten konnten nicht erhoben werden, da sie sich in M9-Minimalmedium als nicht lebensfähig erwiesen. Kulturen aus Vollmedium erreichten nicht die notwendige RNA-Qualität, daher wurden die *surA*-Doppel-KO-Stämme für diesen Versuchsteil nicht berücksichtigt.

4. 2. 2. 2 Cpx- und Bae-Antwort in Deletionsmutanten

Cpx- und Bae-Antwort in *dsbA*-Mutanten

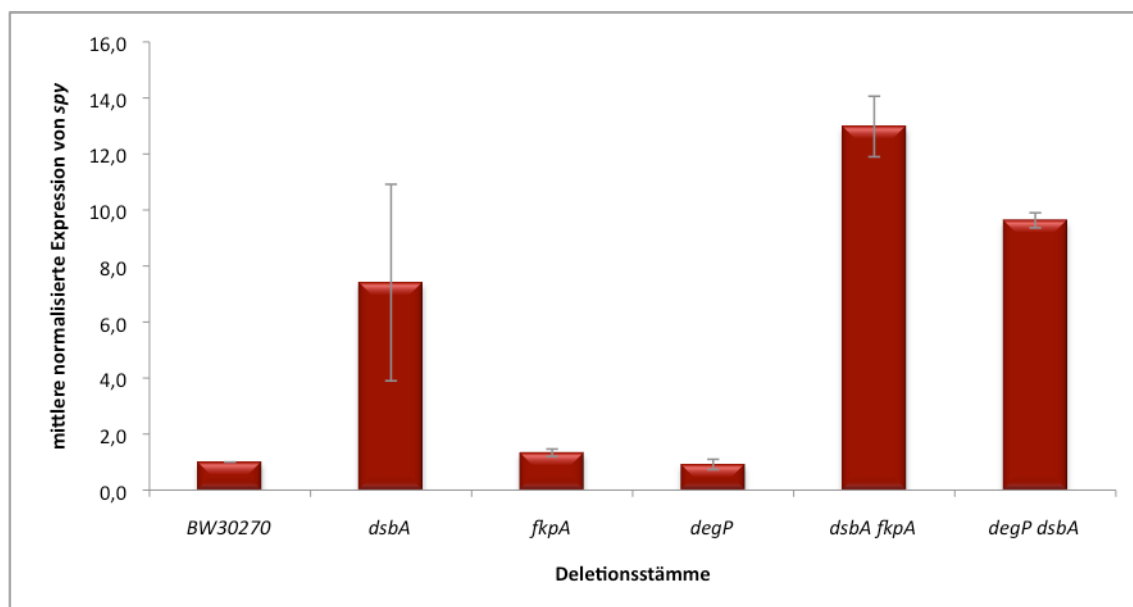


Abb. 4. 15: Relative *spy* Expression in *dsbA*-Doppelmutanten. Dargestellt ist die *spy* Expression verschiedener Doppelmutanten bezogen auf die Expression des Wildtyps BW30270. Die entsprechenden Einzelmутanten sind zum Vergleich aufgeführt. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Die Standardabweichung ist gezeigt, aber nicht beschrieben.

Die Deletion des Gens *dsbA* wirkt sich auf Expression von *spy* deutlich aus. Die Expression ist in der Einzelmутante um das 7,4fache hochreguliert, bei den Doppeldeletionsmutanten *dsbA fkpA* und *degP dsbA* werden sogar Steigerungen um den Faktor 13 bzw. 9,6 erreicht. Im Gegensatz zur *rpoE* Analyse kommt es hier zu einer Verstärkung der Effekte, wenn zusätzlich zu *dsbA* die Gene *fkpA* oder *degP*, welche für eine Prolinisomerase bzw. eine Serinprotease codieren, deletiert werden (siehe Abb. 4. 15).

Cpx- und Bae-Antwort in *degP*-Mutanten

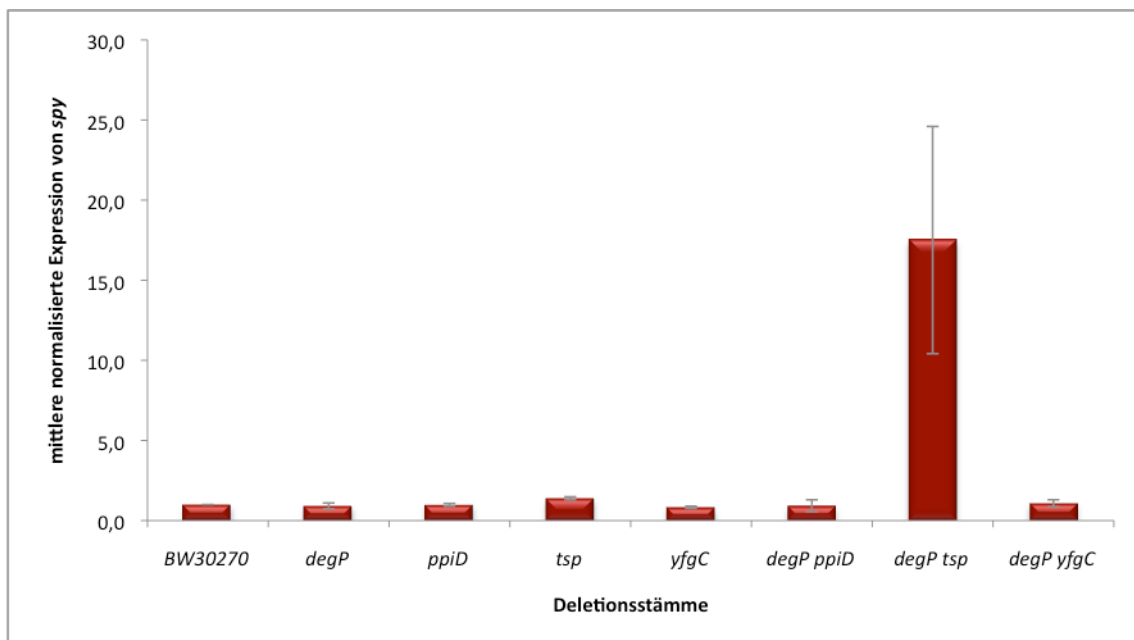


Abb. 4. 16: Relative *spy* Expression in *degP*-Doppelmutanten. Dargestellt ist die *spy* Expression verschiedener Doppelmutanten bezogen auf die Expression des Wildtyps BW30270. Die entsprechenden Einzelmутanten sind zum Vergleich aufgeführt. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Die Standardabweichung ist gezeigt, aber nicht beschrieben.

Die *spy* Expression der Einzelmутanten (siehe Abb. 4. 16) unterscheidet sich nicht signifikant von der des Kontrollstamms. Die *degP*-Doppelmutanten sind ebenfalls nicht auffällig, mit Ausnahme des *degP tsp*-KO-Stamms. Bei der kombinierten Deletion der Gene *degP* und *tsp* kommt es zu einer Steigerung der *spy* Expression um den Faktor 17,5. Dieser Stamm scheint ausgeprägte Faltungsdefekte zu entwickeln, denn alle untersuchten stress-assoziierten Signalwege sind hier induziert.

Cpx- und Bae-Antwort in *tsp*-Mutanten

Die qRT-PCR-Analyse der dargestellten Deletionsstämme lieferte für die Einzelmутanten keine signifikante Regulationsänderung im Vergleich zum Stamm BW30270 (siehe Abb. 4. 17). Bei den korrespondierenden Doppelmutanten konnte jedoch eine Hochregulation der *spy* Expression beobachtet werden. Die Deletionsmutanten *tsp ppiD* und *tsp fkpA* weisen mit einer Erhöhung der Expression um den Faktor 2,4 bzw. 2,2 eine deutliche

Aktivierung der Stressantwort auf. Beim *tsp ydgD*-Deletionsstamm kann sogar eine Steigerung um das 5,1fache beobachtet werden.

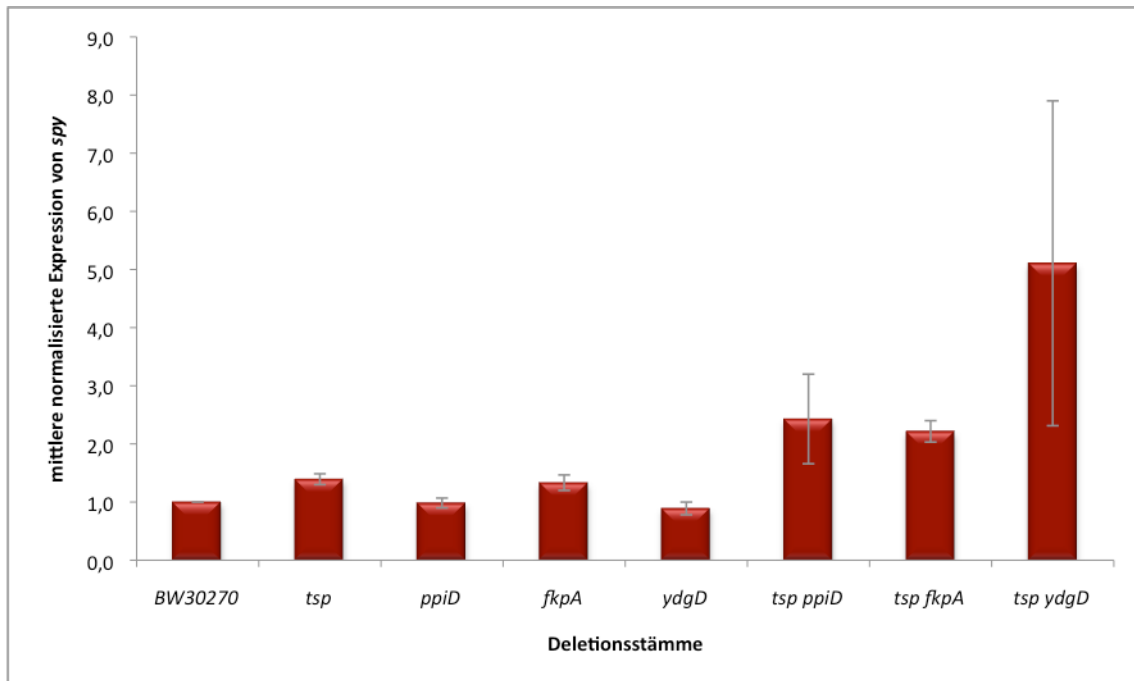


Abb. 4. 17: Relative *spy* Expression in *tsp*-Doppelmутanten. Dargestellt ist die relative *spy* Expression verschiedener Doppelmутanten bezogen auf die Expression des Wildtyps BW30270. Die entsprechenden Einzelmутanten sind zum Vergleich aufgeführt. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Die Standardabweichung ist gezeigt, aber nicht beschrieben.

***Cpx-* und *Bae*-Antwort in *surA*-Mutanten**

Die *surA*-Einzelmутante, welche in keiner der Abbildungen dargestellt ist, zeigt mit einer Hochregulation um den Faktor 3,9 ($\pm 0,1$) im Vergleich zum Kontrollstamm eine deutliche Expressionsänderung, stellt aber nicht, wie bei der Analyse der σ^E -Antwort, die auffälligste Mutante dar. Daten von *surA*-Doppelmутanten konnten auch hier nicht erhoben werden, da sie sich in M9-Minimalmedium als nicht lebensfähig erwiesen und wurden daher für diesen Versuchsteil nicht berücksichtigt.

Vergleicht man die Expressionslevel der Gene *rpoE* und *spy*, zeigt sich (bezogen auf die Einzelmутanten) eine signifikante Aktivierung der Stressantwort in den Doppel-KO-Stämmen *dsbA fkpA*, *dsbA degP*, *degP tsp* und *tsp ydgD*. Die Standardabweichung ist gerade innerhalb dieser Deletionsstämme relativ hoch, auch durch die mehrfache Durchführung des Versuchs

ließen sich die Schwankungen nicht minimieren. Die Schwankungen sind vermutlich auf inhomogene Bakterienpopulationen, in denen verschiedene Suppressormutationen aufgetreten sind, zurückzuführen.

4. 3 Zellhüllproteine von Deletionsmutanten

Mehrere Außenmembranproteine, wie z. B. OmpA, OmpF, OmpC und LamB können in Membranfraktionen der *surA*-Einzelmutante nicht nachgewiesen werden. Da SurA an der Faltung dieser OMPs mitwirkt (Lazar, 1996; Rouvière 1996), scheint die Quantifizierung der Zellhüllproteine von Deletionsstämmen auf mögliche Substrate der entsprechenden Faltungsfaktoren hinzuweisen. Basierend auf dieser Hypothese wurden die 11 Deletionsstämmen mit synthetischen Phänotypen (siehe Abschnitt 4. 1) mittels Western Blot-Analyse untersucht. Auf diese Weise sollten potentielle Redundanzen der Faltungsfaktoren auf Proteinebene verifiziert werden. Insgesamt wurde die Menge von 13 Innen- und 13 Außenmembranproteinen, sowie 13 periplasmatischen Proteinen bestimmt. Das Maltoseporin LamB wurde im Rahmen dieser Analysen anhand seiner Faltungsintermediate näher untersucht.

4. 3. 1 Proteinkonzentration von Zellhüllproteinen

Trotz offensichtlicher Faltungsdefekte der meisten Doppelmutanten (siehe 4. 1 und 4. 2), wurden Mengenunterschiede ausschließlich für die Außenmembranproteine FhuA und OmpW detektiert (mit Ausnahme der bereits publizierten Defekte der *surA*-Mutante; Daten nicht gezeigt), welche in Abb. 4. 18 bis 4. 21 dargestellt sind.

Alle im Folgenden nicht aufgeführten untersuchten KO-Stämme (*dsbA fkpA*, *degP yfgC*, *tsp ppiD*, *tsp fkpA*, *tsp ydgD*) zeigten Proteinmengen, die dem Wildtypstamm bzw. den korrespondierenden Einzelmutanten entsprachen.

4. 3. 1. 1 FhuA

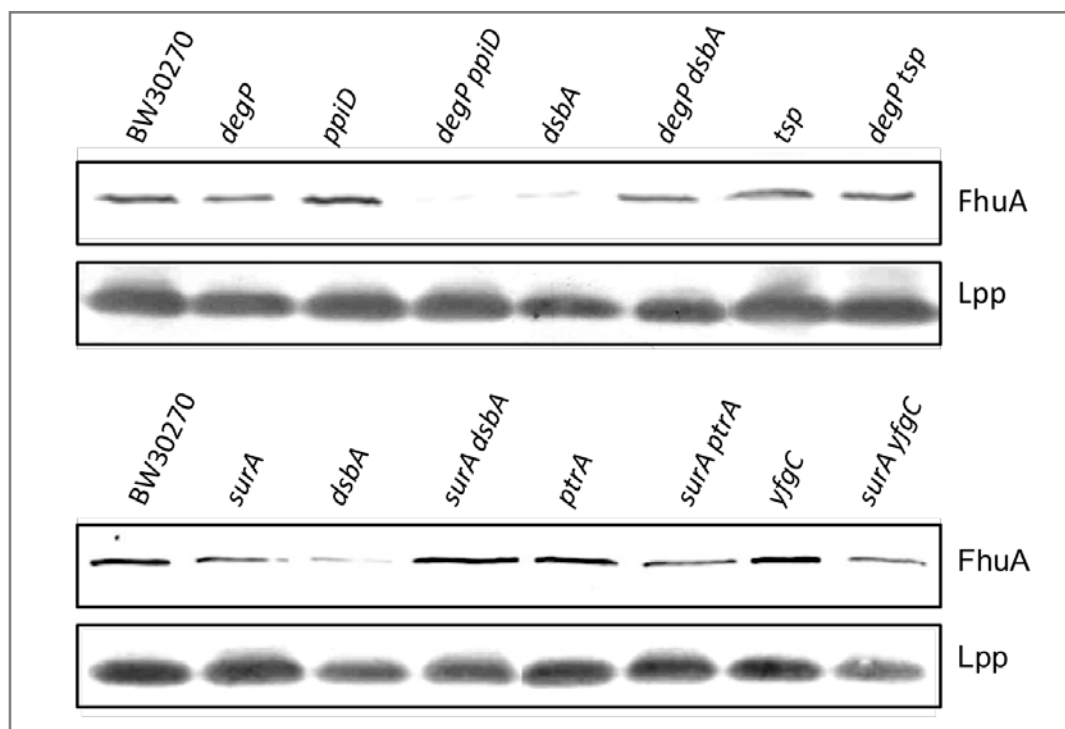


Abb. 4. 18: FhuA Konzentration in Deletionsstämmen. Von den Deletionsstämmen wurde die Außenmembranfraktion gewonnen (siehe 3. 2. 3. 4) und davon 5 µg Protein aufgetragen. Nach der Auftrennung über 4-12 % Bis-Tris-Gele wurde die Expression mittels Western Blot und Antikörperdetektion gegen FhuA analysiert. Als Beladungskontrolle diente Lpp. Angegeben ist immer der relevante Genotyp.

Die Menge von FhuA ist in der *dsbA*- und der *surA*-Einzelmutante leicht vermindert, was sich nicht auf die *degP dsbA*- oder die *surA dsbA*-Deletionsmutante auswirkt. Die *surA*-Doppelmutanten *surA ptrA* und *surA yfgC* spiegeln hingegen erwartungsgemäß die FhuA-Konzentration der *surA*-Einzelmutante wider. Nur im *degP ppiD*-KO-Stamm ist die FhuA-Menge in der Außenmembran deutlich reduziert, obwohl die Expression in den korrespondierenden Einzelmutanten nicht beeinträchtigt ist (siehe Abb. 4. 18). Der *degP tsp*-KO-Stamm und die korrespondierende *tsp*-Einzelmutante zeigen keine Effekte.

Die Aktivierung des σ^E -Signalwegs durch Faltungsstress reprimiert die Synthese von Außenmembranproteinen (Vertommen, 2009). Daher wurden als zusätzliche Kontrolle qRT-PCR-Analysen von den untersuchten Deletionsstämmen für die Gene *fhuA* und *ompW* durchgeführt. Die Expressionsanalyse auf RNA-Ebene sollte klären, ob mögliche Effekte

tatsächlich auf Faltungsdefekte im Periplasma hinweisen oder durch die reduzierte Genexpression verursacht werden (siehe Abb. 4. 19).

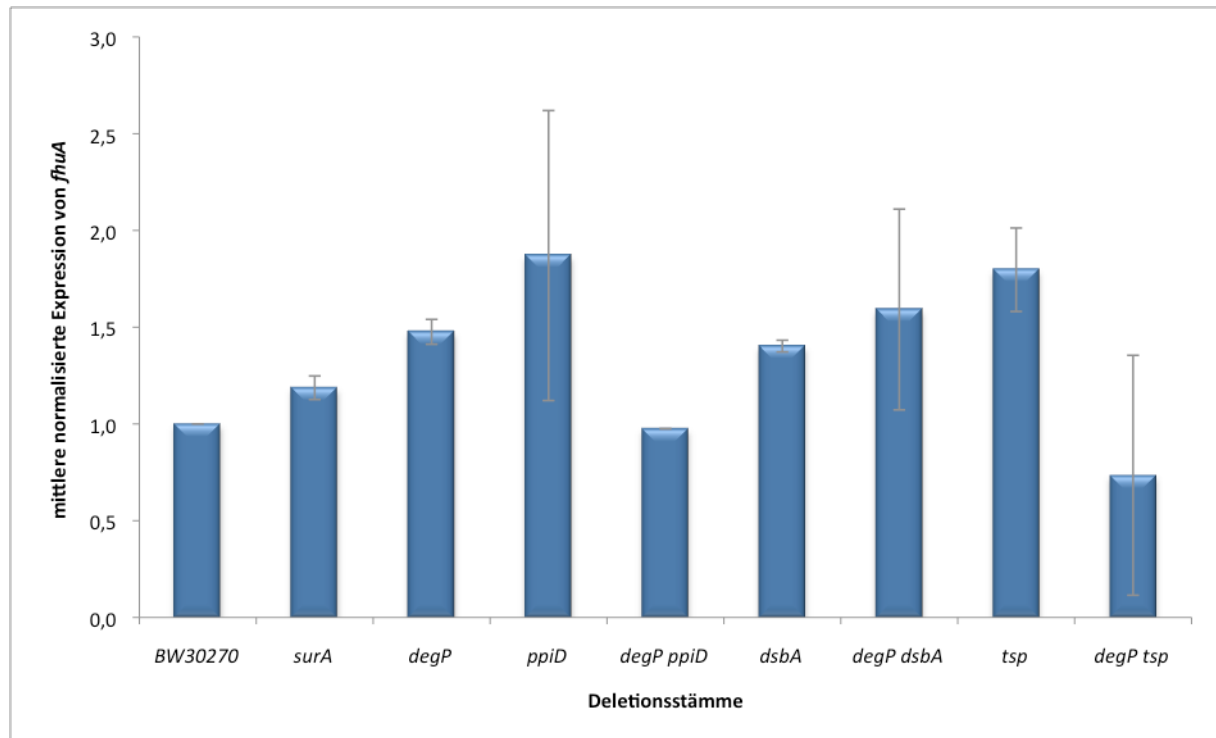


Abb. 4. 19: Relative *fhuA* Expression in verschiedenen Deletionsstämmen. Dargestellt ist die *fhuA* Expression verschiedener Mutanten bezogen auf die Expression des Wildtyps BW30270. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Die Standardabweichung ist gezeigt, aber nicht beschrieben.

Die Analyse mittels qRT-PCR ergab keine reduzierte Genexpression von *fhuA* in den relevanten Deletionsstämmen. Der Wert für den *degP ppiD*-KO-Stamm lag bei 0,97 im Vergleich zum Wildtyp BW30270, die *fhuA* Expression in den beiden Einzeldelentionsmutanten *dsbA* und *surA* war mit Werten von 1,4 bzw. 1,2 ebenfalls nicht signifikant reguliert. Damit bestätigt sich, dass die Effekte in diesen Stämmen auf Proteinebene zu suchen sind.

Die *degP tsp*-Deletionsmutante zeigt keine signifikante Reduktion, berücksichtigt man allerdings die Standardabweichung, so müssten sich auch auf Proteinebene Veränderungen widerspiegeln. Da dies nicht der Fall ist und die FhuA-Menge in diesem Stamm im Vergleich zum Kontrollstamm unverändert bleibt, scheint der Mittelwert der RNA-Analyse eine realistische Einschätzung zu liefern.

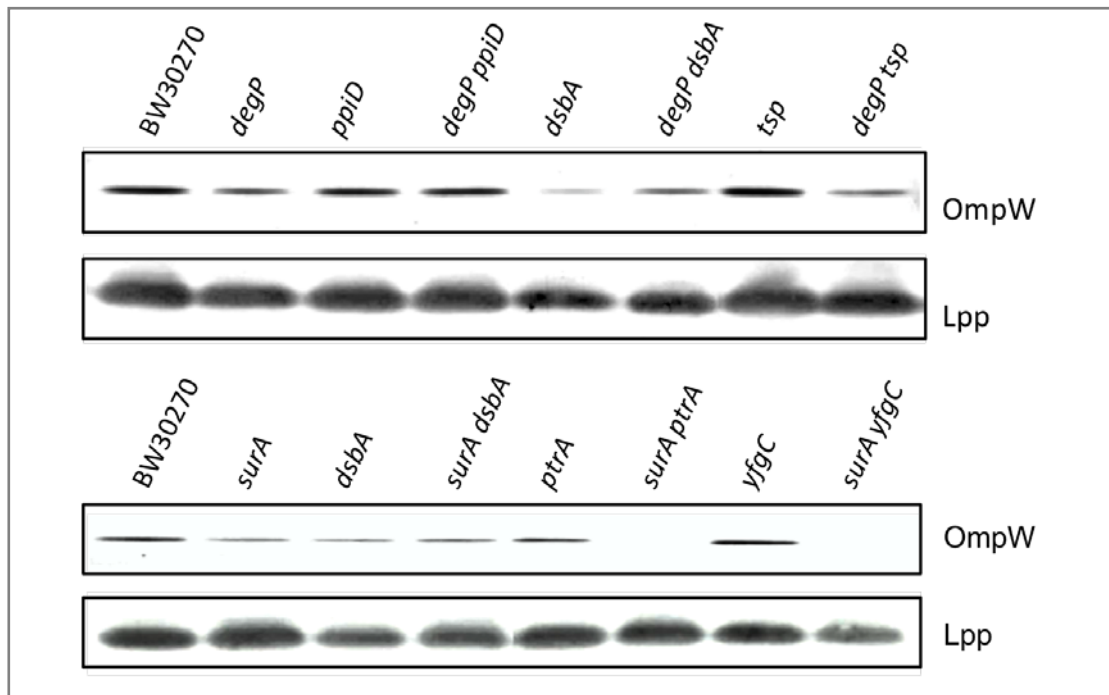
4. 3. 1. 2 *OmpW*

Abb. 4. 20: OmpW Konzentration in Deletionsstämmen. Von den Deletionsstämmen wurde die Außenmembranfraktion gewonnen (siehe 3. 2. 3. 4) und davon 5 µg Protein aufgetragen. Nach der Auftrennung über 4-12 % Bis-Tris-Gele wurde die Expression mittels Western Blot und Antikörperdetektion gegen OmpW analysiert. Als Beladungskontrolle diente Lpp. Angegeben ist immer der relevante Genotyp.

Die OmpW-Menge ist in der *degP*-Einzelmutante und in der *degP dsbA*-Doppeldeletionsmutante gleichermaßen minimiert. Unter Berücksichtigung der Beladungskontrolle scheint die Reduktion der OmpW-Menge in der Außenmembran der *degP tsp*-Doppeldeletionsmutante am deutlichsten zu sein (siehe Abb. 4. 20). Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse (siehe Abb. 4. 21) zeigen, dass die *ompW* Expression in dem *degP tsp*-KO-Stamm mit einem Mittelwert von 0,9 auf RNA-Ebene nicht reduziert ist. Die Defekte sind folglich auf Proteinebene zu finden. Aufgrund der hohen Standardabweichung kann diese Aussage jedoch nur unter Vorbehalt getroffen werden.

Auch in den *surA*- und *dsbA*-Einzelmutanten ist die OmpW-Konzentration leicht vermindert (siehe Abb. 4. 20), was im Fall von *surA* vermutlich auf die reduzierte Genexpression in diesem Stamm zurückzuführen ist (siehe Abb. 4. 21). Kombiniert man die *surA*- und die *dsbA*-Deletion, bleibt die OmpW-Menge in der Außenmembran der resultierenden Doppelmutante unverändert. Im Gegensatz dazu kann das Protein in den

Membranfraktionen der Doppeldeletionsmutanten *surA ptrA* und *surA yfgC* mittels Western Blot nicht mehr nachgewiesen werden. Diese beiden Stämme können mittels qRT-PCR nicht analysiert werden (siehe 4. 2. 2). Daher kann nicht eindeutig ermittelt werden, ob dieser Effekt seine Ursachen auf RNA- oder Proteinebene hat.

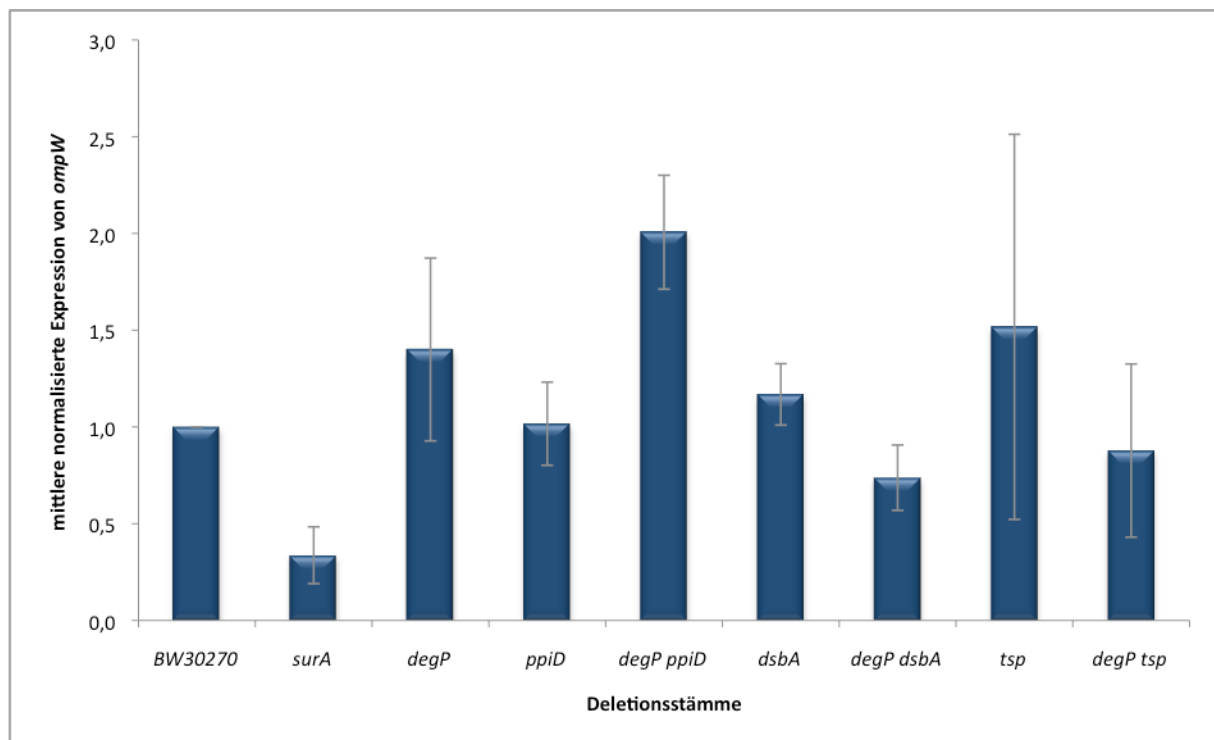


Abb. 4. 21: Relative *ompW* Expression in verschiedenen Deletionsstämmen. Dargestellt ist die *ompW* Expression verschiedener Mutanten bezogen auf die Expression des Wildtyps BW30270. Angegeben ist immer der relevante Genotyp. Die Standardabweichung ist gezeigt, aber nicht beschrieben.

4. 3. 2 Faltungsintermediate des Außenmembranproteins LamB

LamB ist ein trimeres Außenmembranprotein, über das Maltose und Maltosepolymere in die Bakterienzelle aufgenommen werden können. Die Assemblierung von LamB verläuft in geordneten Schritten. Das ungefaltete LamB-Vorläuferprotein wird durch die Abspaltung der Signalsequenz im Periplasma zur ungefalteten reifen Form prozessiert, in gefaltetes Monomer umgewandelt und schließlich zum Trimer oligomerisiert. Wie bei anderen trimere OMPs bleiben die verschiedenen, periplasmatischen Faltungsintermediate, ebenso wie die trimere Form, während der Elektrophorese in einem SDS-Gel stabil, wenn die Bakterien unter nicht-denaturierenden Bedingungen lysiert und die Proben nicht aufgeköcht werden (Ureta, 2007). Während der Elektrophorese zeigen sich die Intermediate aufgrund ihrer unterschiedlich kompakten Formen und multimeren Strukturen auf charakteristischer Laufhöhe, wie in Abb. 4. 22 dargestellt.

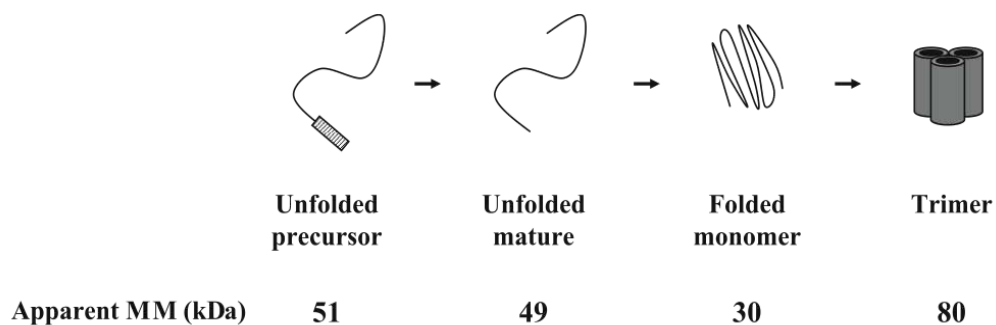


Abb. 4. 22: Faltungsintermediate von LamB nach Ureta, 2007. Angegeben sind die apparenten Molekulargewichte der Intermediate in einem 10 % SDS-Gel.

Um mögliche Defekte im Faltungsweg von LamB zu untersuchen, wurden Proben der 11 Doppelmutanten mit synthetischem Phänotyp, zusammen mit ihren korrespondierenden Einzel-KO-Stämmen, gelelektrophoretisch untersucht. Dazu wurden die Proben nach dem *Gentle Lysis*-Protokoll (siehe 3. 2. 3. 9) vorbereitet und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Faltungsintermediate wurden anschließend anhand von Western Blots mit LamB-Antikörper detektiert (siehe Abb. 4. 23 bis 4. 26).

4. 3. 2. 1 *DegP*-Doppelmutanten

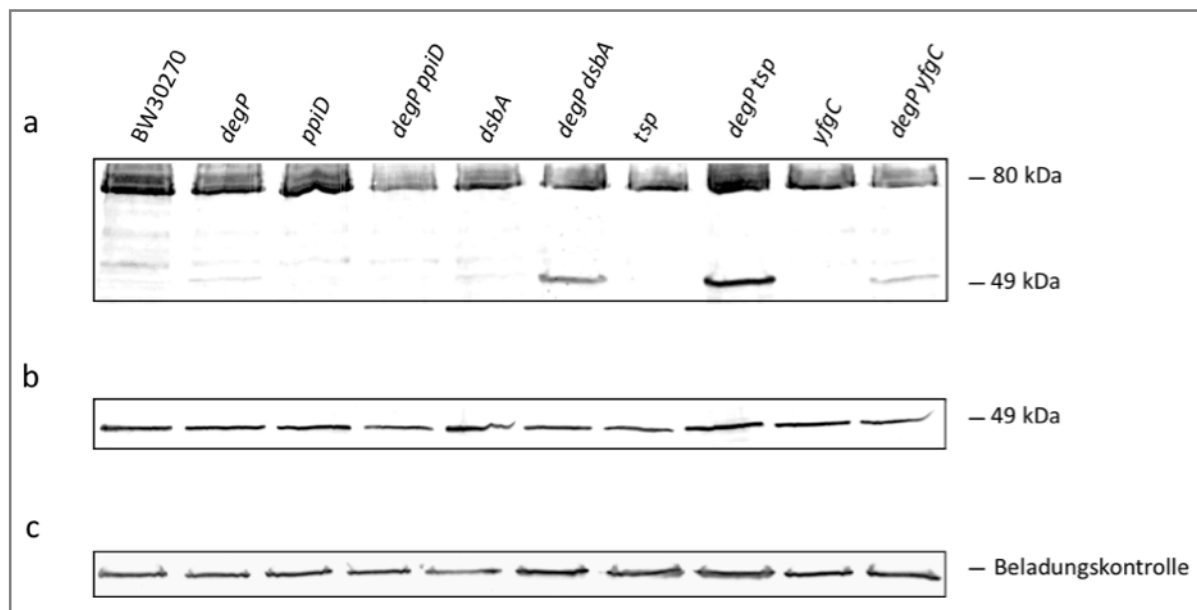


Abb. 4. 23: LamB-Faltungsintermediate in *degP*-Doppelmutanten. Die Einzelmutanten sind zum Vergleich aufgeführt. Bakterien aus Übernachtskulturen wurden nach dem *Gentle Lysis*-Protokoll (siehe 3. 2. 3. 9) vorbereitet und für **a)** 10 Minuten bei 37°C erwärmt oder **b)** 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Pro Spur wurden 10 µl Probe aufgetragen. Die Bande des Western Blots bei 80 kDa entspricht dem LamB-Trimer, die Bande bei 49 kDa dem ungefalteten, reifen Monomer. **c)** Die aufgeköchten Proben wurden zur Beladungskontrolle genutzt, detektiert wurde Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Angegeben ist immer der relevante Genotyp.

Die *degP*-Einzelmutante zeigt eine schwache Bande bei 49 kDa, welche dem ungefalteten, reifen Monomer entspricht. Die anderen Einzeldelensionsstämme sind unauffällig, ganz im Gegensatz zu ihren korrespondierenden Doppelmutanten. So findet sich im Doppeldeletionsstamm *degP yfgC* eine etwas stärkere 49 kDa-Bande als in der *degP*-Einzelmutante. Ausgeprägter sind die Banden auf dieser Laufhöhe hingegen bei den beiden KO-Stämmen *degP dsbA* und *degP tsp*, in denen deutliche Mengen des ungefalteten LamB-Monomers akkumulieren. Das LamB-Trimer ist in allen Stämmen vorhanden, doch ist die Menge im *degP ppID*- und *degP yfgC*-KO-Stamm leicht reduziert. Werden die Proben vor der Elektrophorese aufgeköcht, damit sich alle Strukturen zum ungefalteten Monomer auflösen, zeigt sich, dass sich die Stämme in ihrer gesamtzellulären LamB-Konzentration nicht unterscheiden (siehe Abb. 4. 23).

Betrachtet man die Außenmembranfraktion dieser Stämme mit Hinblick auf die Menge an eingebautem LamB, so ergeben sich hier, abgesehen von der *dsbA*-Einzelmutante, ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 4. 24).

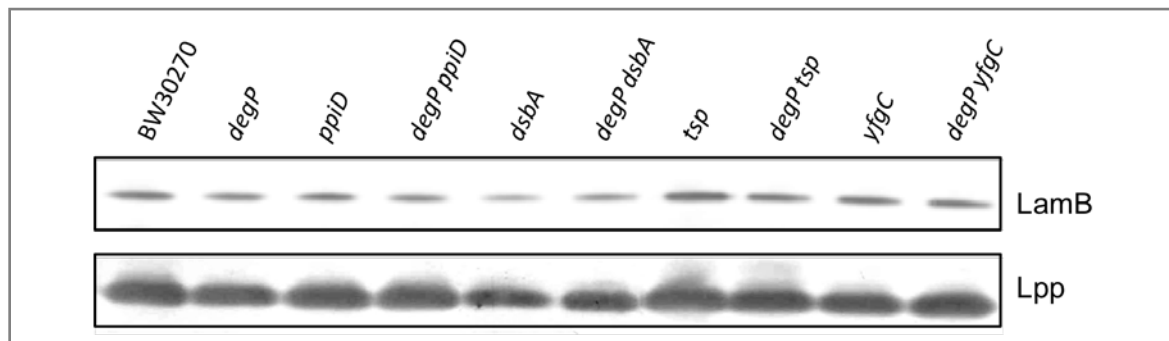


Abb. 4. 24: LamB Expression in *degP*-Doppelmutanten. Die Einzelmutanten sind zum Vergleich aufgeführt. Von den Deletionsstämmen wurde die Außenmembranfraktion gewonnen (siehe 3. 2. 3. 4) und davon 0,5 µg Protein aufgetragen. Nach der Auftrennung über 4-12 % Bis-Tris-Gele wurde die Expression mittels Western Blot und Antikörperdetektion gegen LamB analysiert. Als Beladungskontrolle diente Lpp. Angegeben ist immer der relevante Genotyp.

4. 3. 2. 2 *SurA*-Doppelmutanten

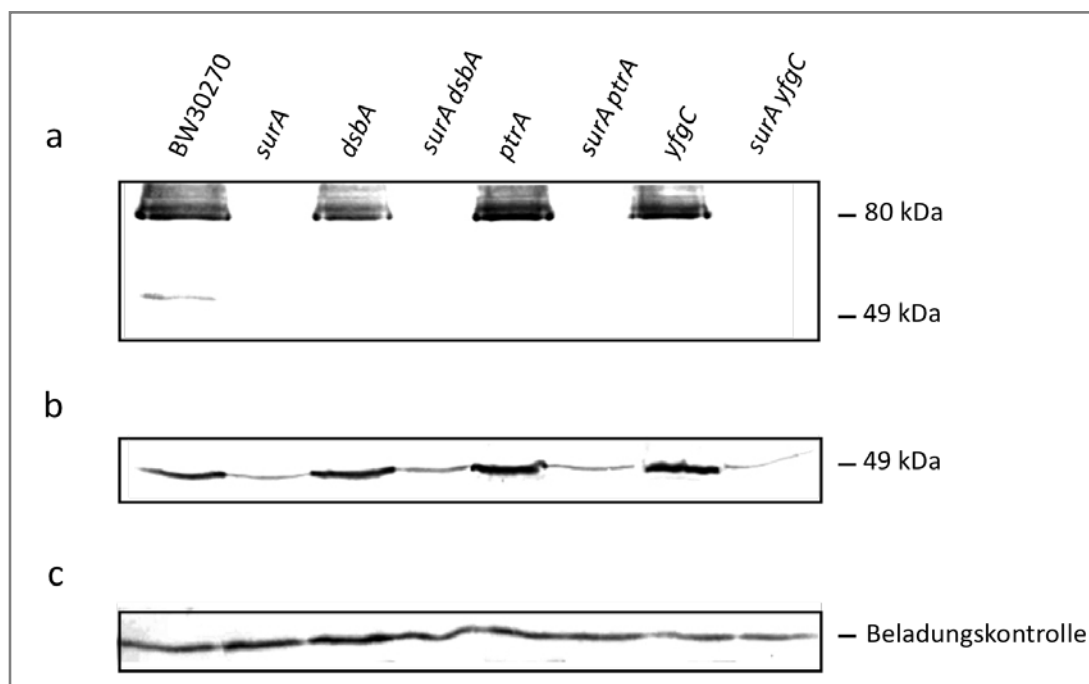


Abb. 4. 25: LamB-Faltungsintermediate in *surA*-Doppelmutanten. Die Einzelmutanten sind zum Vergleich aufgeführt. Bakterien aus Übernachtskulturen wurden nach dem *Gentle Lysis*-Protokoll (siehe 3. 2. 3. 9) vorbereitet und für **a)** 10 Minuten bei 37°C erwärmt oder **b)** 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Pro Spur wurden 10 µl Probe aufgetragen. Die Bande des Western Blots bei 80 kDa entspricht dem LamB-Trimer, die Bande bei 49 kDa dem ungefalteten, reifen Monomer. **c)** Die aufgeköchten Proben wurden zur Beladungskontrolle genutzt, detektiert wurde Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Angegeben ist immer der relevante Genotyp.

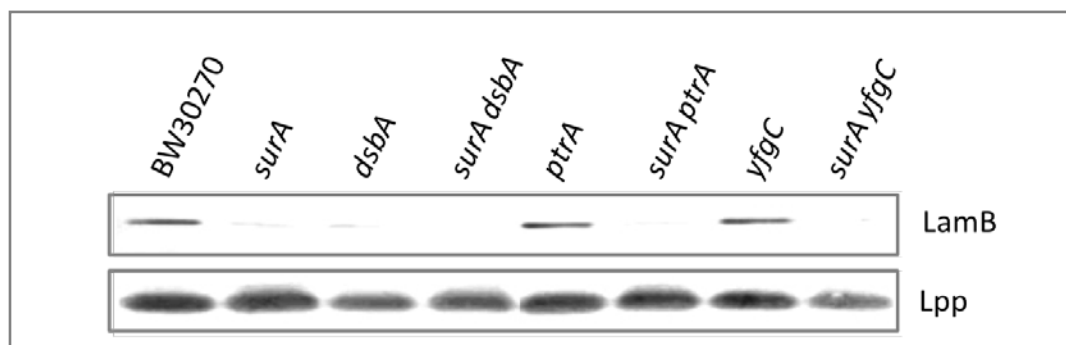


Abb. 4. 26: LamB Expression in *surA*-Deletionsstämmen. Die Einzelmутanten sind zum Vergleich aufgeführt. Von den Deletionsstämmen wurde die Außenmembranfraktion gewonnen (siehe 3. 2. 3. 4) und davon 0,5 µg Protein aufgetragen. Nach der Auftrennung über 4-12 % Bis-Tris-Gele wurde die Expression mittels Western Blot und Antikörperdetektion gegen LamB analysiert. Als Beladungskontrolle diente Lpp. Angegeben ist immer der relevante Genotyp.

In der *surA*-Mutante und ihren entsprechenden Doppel-KO-Stämmen kann LamB weder als Intermediat noch als reifes Trimer detektiert werden (siehe Abb. 4. 25). Diese Ergebnisse werden, unter Berücksichtigung der Beladungskontrolle, von der Analyse der Außenmembranfraktionen dieser Stämme bestätigt (siehe Abb. 4. 26). Lediglich die aufgekochten Gesamtzellextrakte zeigen geringe LamB-Mengen in den *surA*-Mutanten (siehe Abb. 4. 25).

4. 4 Komplementationsassays Protease-defizienter Mutanten

Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erwiesen sich die beiden Metalloproteasen PtrA und YfgC neben den Serinproteasen DegP und Tsp als wichtige Bestandteile der Proteinqualitätskontrolle. Mit Hilfe von Komplementationsassays sollten erste Hinweise auf mögliche Chaperonaktivitäten dieser Proteine gewonnen werden, um somit die Funktionen der Proteasen im Rahmen der Proteinqualitätskontrolle genauer einordnen zu können.

Hierfür wurden die entsprechenden Stämme mit Expressionsplasmiden transformiert, welche jeweils ein deletiertes Gen komplementieren sollten. Zur Untersuchung möglicher Chaperonaktivitäten wurden u. a. Genvarianten mit Punktmutationen in die Deletionsmutanten eingebracht. Die entsprechenden Plasmide exprimieren aufgrund eines gezielten Aminosäureaustauschs Proteine mit inaktiver Proteasefunktion (S->A bei Serinproteasen, E->Q bei Metalloproteasen). Einzelne Transformanten wurden auf NZA-Platten ausgestrichen und ihr Wachstum unter zwei Stressbedingungen getestet. Die

Ergebnisse der Komplementationsassays bei 42°C und unter hyperosmolaren Bedingungen (500 mM NaCl) bei 37°C sind in Tab. 4. 5 dargestellt.

Tab. 4. 5: Wachstum komplementierter Deletionsstämmen unter Stressbedingungen. Sowohl bei den Deletionsstämmen als auch bei den Plasmiden ist immer der relevante Genotyp angegeben. Genaue Beschreibungen zum Leervektor (pLV), der als Kontrolle mitgeführt wurde, und zu den Expressionsplasmiden sind der Tab. 3. 4 zu entnehmen. Der Zusatz EQ bzw. SA bezeichnet inaktive Proteasen. Alle Stämme die mit „+++“ gekennzeichnet sind, wuchsen genauso gut wie der Wildtyp, die Bezeichnung „++“ weist auf ein sichtbar schlechteres Wachstum hin. Mutanten, die nur wenige Kolonien ausbildeten, sind mit „+“, letale Phänotypen mit „-“ beschrieben.

	Amp 42°C	NaCl 37°C
BW30270	+++	+++
surA ptrA +pLV	+++	-
+pSurA	+++	+++
+pPtrA	+++	-
+pPtrA-EQ	+++	-
surA yfgC +pLV	blasser Hof	-
+pSurA	+++	+++
+pYfgC	++	-
+pYfgC-EQ	++	-
degP dsbA +pLV	+	+++
+pDegP	+++	+++
+pDegP-SA	+	+++
+pDsbA	+	+++
degP tsp +pLV	-	+
+pDegP	+++	+++
+pDegP-SA	+	+++
+pTsp	++	+++
+pTsp-SA	+	+++

Die *surA*-Doppelmutanten zeigen nach der Transformation unter hyperosmolaren Bedingungen einen ausgeprägteren Phänotyp als bisher festgestellt. Anstatt erst ab 42°C sind sie mit Leervektor schon bei 37°C letal. Dieser Phänotyp lässt sich in allen *surA*-Doppelmutanten nur durch die Expression der Prolinisoimerase SurA komplementieren. Die Assays wurden ohne die Zugabe von Induktor durchgeführt, da die Bakterien auf die Zugabe geringster Mengen Anhydrotetracyclin sensitiv reagierten. Möglicherweise ist für die

Komplementation durch die beiden Metalloproteasen PtrA und YfgC jedoch eine höhere Konzentration dieser Proteine in der Zelle notwendig. Bei erhöhter Temperatur zeigt der *surA ptrA*-KO-Stamm keinen sichtbaren Phänotyp, doch die unter diesen Bedingungen auffällige Morphologie der *surA yfgC*-Deletionsmutante (siehe Abb. 4. 5) kann sogar ohne Induktion der Plasmide geändert werden. Nicht nur die Expression der Prolinisomerase SurA komplementiert den Phänotyp, auch die aktive Form der Metalloprotease YfgC, sowie die EQ-Mutante ohne Proteasefunktion führen zu einer normalen Morphologie der Kolonien.

Die *degP dsbA*-Deletionsmutante zeigt unter hyperosmolaren Bedingungen bei 37°C keinen auffälligen Phänotyp, bei 42°C wächst sie hingegen kaum noch. Wie zu erwarten, können auch geringe Mengen der Serinprotease DegP das Wachstum deutlich verbessern. Die SA-Mutante ohne Proteasefunktion und die Oxidoreduktase DsbA verändern den Phänotyp jedoch nicht. Der *degP tsp*-KO-Stamm wächst unter hyperosmolaren Bedingungen deutlich schlechter als der Wildtyp, der Wachstumsdefekt lässt sich jedoch von beiden Serinproteasen und den entsprechenden inaktiven Formen komplementieren. Bei erhöhten Temperaturen ist der *degP tsp*-KO-Stamm letal, durch die Expression von DegP bzw. Tsp lässt sich das Wachstum allerdings rekonstituieren. Auch die beiden inaktiven SA-Mutanten komplementieren den Phänotyp, wenn auch in geringerem Ausmaß als die aktiven Proteasen.

4. 5 Redundante Funktionen von DegP und Tsp

Synthetische Phänotypen von Doppel-KO-Stämmen weisen auf redundante Funktionen der entsprechenden Genprodukte hin. Diese mögliche Redundanz wurde exemplarisch an den beiden Serinproteasen DegP und Tsp genauer untersucht, denn der *degP tsp*-KO-Stamm weist schwerwiegende Membrandefekte auf und die Stressantwort in diesem Stamm ist deutlich aktiviert, wie die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit belegen. Zur genaueren Charakterisierung möglicher identischer Funktionen der Proteasen DegP und Tsp wurden daher verschiedene biochemische Untersuchungen durchgeführt.

4. 5. 1 Reinigung von Tsp

Für die Reinigung wurde rekombinantes Tsp zunächst in *E. coli* DH5 α -Zellen überproduziert. Nach dem Zellaufschluss erfolgte die Reinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie über Ni-TED- und Ni-NTA-Säulen (siehe 3. 2. 3. 10). Um den Erfolg der Reinigung zu kontrollieren, wurden nach allen Reinigungsschritten 10 μ l Probe abgenommen und mit Hilfe der SDS-PAGE (siehe 3. 2. 3. 5) und anschließender Coomassie-Färbung (siehe 3. 2. 3. 6) analysiert. In Abb. 4. 27 ist exemplarisch der Verlauf einer Tsp-SA-Reinigung dargestellt. Für die Reinigung der aktiven Tsp-Form wurde dasselbe Protokoll benutzt.

In Abb. 4. 27 ist die effektive Induktion der Tsp-Expression im Lysat (L) zu erkennen. Nach Auftragen des geklärten Zelllysats auf die Ni-TED-Säulen konnten mit Hilfe der anschließenden Waschschrte (W1-W3) Verunreinigungen von der Ni-TED-Säule entfernt werden, wobei es auch zu einem leichten Verlust an Tsp kam. Durch Steigerung der Imidazolkonzentration auf 150 mM im Puffer wurde Tsp eluiert (E1-E3). Unterhalb der Tsp-Bande ist bei 38 kDa eine Verunreinigung zu erkennen, die anhand eines Western Blots als *lac*-Repressor identifiziert wurde (Daten nicht gezeigt). Durch weitere Reinigungsschritte über eine Ni-NTA-Säule konnte die Verunreinigung größtenteils entfernt werden.

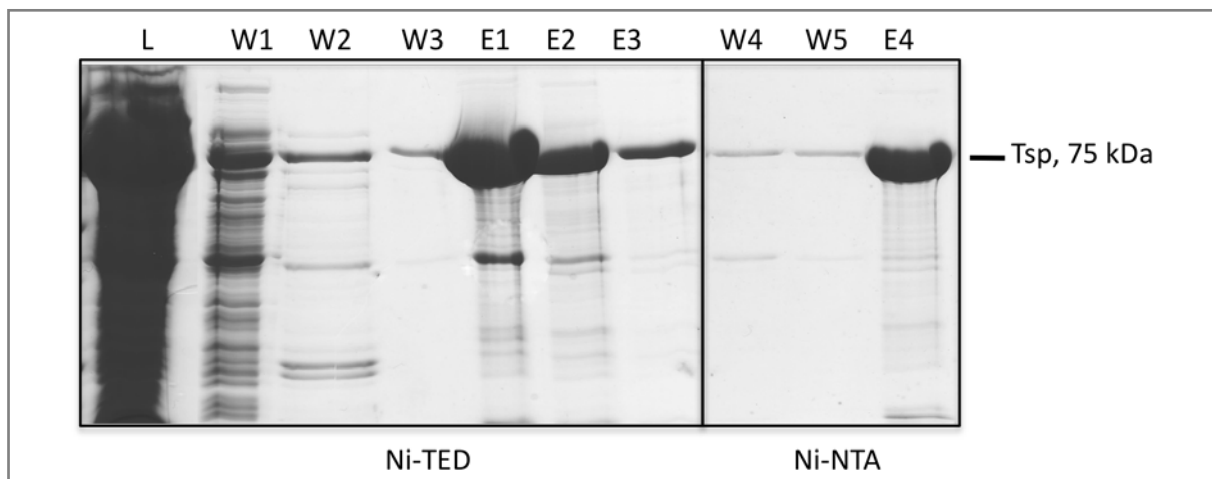


Abb. 4. 27: Reinigung von Tsp-SA. Die Reinigung des Proteins wurde über Ni-TED- und Ni-NTA-Säulen vorgenommen. Die Abbildung zeigt die SDS-PAGE-Analyse der Proben, die nach jedem Reinigungsschritt entnommen wurden (L: Lysat; W1: Waschschrte mit LEW-Puffer; W2: LEW-Puffer, 1 M NaCl; W3: LEW-Puffer, 3 mM Imidazol; E1 - E3: Elution mit LEW-Puffer, 150 mM Imidazol; W4: LEW-Puffer; W5: LEW-Puffer, 30mM Imidazol; E4: LEW-Puffer, 500 mM Imidazol).

4. 5. 2 Proteolyse von β -Casein und RseA durch die Serinproteasen DegP und Tsp

Ob DegP und Tsp tatsächlich identische Substrate abbauen können, sollte im folgenden Versuch geklärt werden. Zwei bereits bekannte DegP-Substrate wurden für eine vergleichende Proteolyse ausgewählt: β -Casein, ein Milchprotein ohne Sekundärstrukturen und RseA, ein periplasmatisches Protein, welches ebenfalls wenige Sekundärstrukturen aufweist. Bei 37°C wurden 5 μ g β -Casein (25 kDa) bzw. 5 μ g RseA₁₂₁₋₂₁₆ (13 kDa) mit jeweils 10 μ g DegP (50 kDa) oder Tsp (75 kDa) in Reaktionspuffer inkubiert. Die Proteolysereaktion wurde durch Zugabe von SDS-Ladepuffer und Erhitzen auf 95°C für 5 min gestoppt. Die Produkte des Verdaus wurden mittels 10 % Bis-Tris-Gelen und Coomassie-Färbung analysiert und sind in Abb. 4. 28 dargestellt.

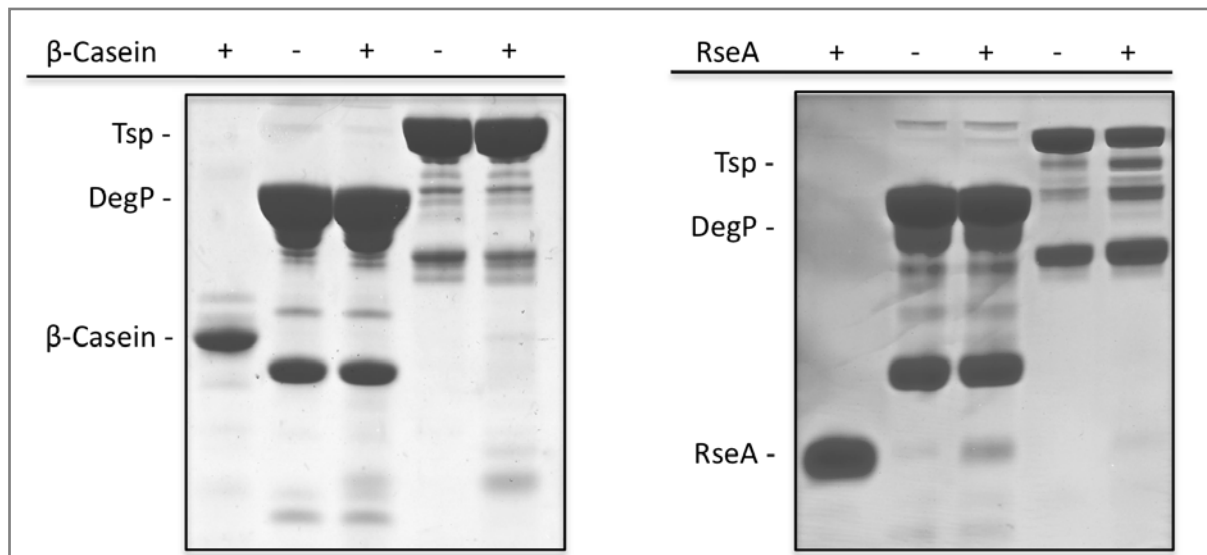


Abb. 4. 28: Proteolyse von β -Casein und RseA durch die Serinproteasen DegP und Tsp. Der β -Casein-Verdau wurde bei 37°C für 10 min, der RseA-Verdau bei 37°C für 2 h in 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8 inkubiert. Gereinigtes DegP wurde freundlicherweise von M. Merdanovic und M. Meltzer, gereinigtes RseA von S. Hasenbein zur Verfügung gestellt. Bei allen zusätzlichen Banden handelt es sich um Abbauprodukte, die durch die Autoproteolyse von DegP und Tsp entstehen.

Das Protein β -Casein wird innerhalb von 10 min sowohl von DegP als auch von Tsp abgebaut. Der σ^E -Regulator RseA ist nach 2 h noch nicht vollständig durch DegP abgebaut, dennoch wird deutlich, dass Tsp und DegP β -Casein bzw. RseA abbauen können. Dieser Versuch liefert daher erste Hinweise, dass Tsp und DegP eine ähnliche Substratspezifität besitzen.

4. 5. 3 Tsp-Aktivitätstest mit dem DegP-Substrat DPMFKLV-pNA

Die Substratspezifität von DegP ist gut untersucht. Neben β -Casein und RseA kann DegP Citratsynthase und Malatdehydrogenase abbauen. Abgeleitet von den Sequenzen dieser beiden Enzyme, wurde ein synthetisches Oligopeptid mit einer p-Nitroanilin Gruppe (pNA) an Position P₁ entwickelt (Hauske, 2009). Inkubiert man DegP mit dem pNA-Substrat, führt die Abspaltung des pNAs zu einem Absorptionsanstieg bei 405 nm, welcher quantifiziert werden kann (siehe 3. 2. 3. 11). Zur genaueren Charakterisierung der möglichen Redundanz von DegP und Tsp wurde die proteolytische Aktivität beider Enzyme in einem Aktivitätstest mit dem DegP-Substrat DPMFKLV-pNA untersucht.

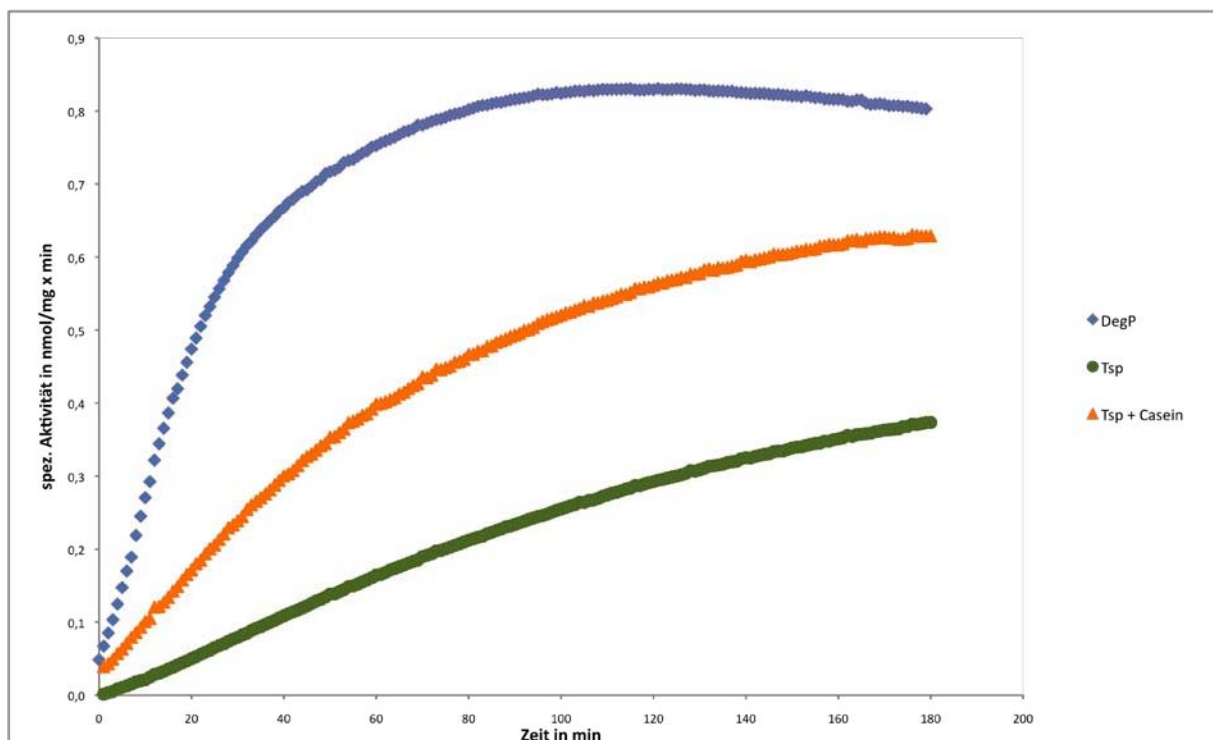


Abb. 4. 29: Aktivitätstest von DegP und Tsp mit dem Substrat DPMFKLV-pNA. DegP (0,5 μ g) und Tsp (7,5 μ g) wurden in 100 μ l NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8 bei 37°C für 5 min vorinkubiert. Nach Zugabe von 0,5 mM pNA-Substrat wurde die Absorption bei 405 nm alle 2 min über einen Zeitraum von 3 h bei 37°C gemessen. Tsp wurde zusätzlich mit 20 μ g β -Casein aktiviert.

Tsp ist mit einer spezifischen Aktivität von 10,4 nmol/mg x min zwar deutlich langsamer als DegP (849,3 nmol/mg x min), dennoch zeigt sich, dass auch Tsp das pNA-Substrat umsetzen kann. Zudem kann Tsp, wie DegP (Dissertation M. Meltzer, 2008), durch die Zugabe von β -Casein um den Faktor 2,5 aktiviert werden, was auf allosterische Effekte hinweist.

Figure 2 displays sequence logos for the binding sites of Tsp and DegP. Panel (a) shows the Tsp binding site, and panel (b) shows the DegP binding site. The y-axis represents information content in bits (0 to 2). The x-axis shows positions 1 to 10. The logos indicate that Tsp binds to a sequence with a high information content at position 9 (LGA), while DegP binds to a sequence with a high information content at position 10 (FLF).

Vergleicht man die Sequenzspezifitäten der PDZ-Domänen von Tsp und DegP, so zeigt sich bei beiden Proteasen eine Präferenz für unpolare, hydrophobe Aminosäuren. Es ergeben sich drei Peptide (YVKEWRQQLA, LSQINQAKLA, NWRVQAILYA), die von den PDZ-Domänen beider Serinproteasen gebunden werden.

5 Diskussion

5. 1 Redundante Faktoren der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle

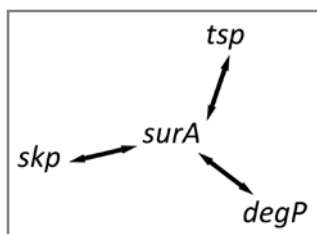
Umfassende Studien an Hefen, Bakterien und Mäusen ergaben, dass durchschnittlich nur 6 % - 19 % der Protein-codierenden Gene essentiell sind. Einzelne Mutationen in den übrigen Genen können aufgrund von funktionellen Redundanzen ausgeglichen werden (Harrison, 2007). Zur Identifizierung von Genen bzw. Proteinen mit redundanter Funktion eignet sich die Analyse von synthetischen Phänotypen. Synthetische Phänotypen manifestieren sich nur in Abhängigkeit von zwei Mutationen in der gleichen Zelle, eine einzelne Mutation bewirkt keinen ausgeprägten Phänotyp (Flower, 1995). Wenn Mutationen in zwei unterschiedlichen Genen einen Phänotyp verursachen, spricht man auch von einer synthetischen genetischen Interaktion, die auf redundante Funktionen der entsprechenden Genprodukte hinweist. Proteine mit redundanter Funktion müssen der Theorie zufolge in parallelen Stoffwechsel- bzw. Signalwegen organisiert sein, um einzelne Defekte kompensieren zu können. Die Charakterisierung von synthetischen Phänotypen bzw. der zugrunde liegenden genetischen Interaktionen eignet sich daher zur Aufklärung möglicher Faltungswege innerhalb der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle. Tatsächlich ergaben Deletionsstudien letale Kombinationen für Nullmutationen in *surA* und *skp* bzw. *surA* und *degP*, wohingegen die *skp degP*-Doppelmutante gänzlich unauffällig war. DegP und Skp müssten demnach Bestandteile eines gemeinsamen Faltungswegs sein, um so den Verlust von SurA im parallelen Weg kompensieren zu können (Rizzitello, 2001). Basierend auf dieser Theorie wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit jeweils zwei gut untersuchte, nicht essentielle, periplasmatische Faltungsfaktoren (siehe Tab. 5. 1) in verschiedenen Kombinationen in *E. coli* deletiert und die unter optimalen bzw. Faltungsstress-assoziierten Wachstumsbedingungen resultierenden synthetischen Phänotypen charakterisiert. Diese Phänotypen (letale Doppel-KO-Stämme und Mutanten mit Membrandefekten) werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

Tab. 5. 1: Periplasmatische Faltungsfaktoren

Chaperone	Oxidoreduktasen	Prolinisomerasen	Serinproteasen	Metalloproteasen
Skp	DsbA	FkpA	DegP	PtrA
	DsbC	PpiA	Tsp	YcaL
		PpiD	YdgD	YfgC
		SurA		YggG

5. 1. 1 Die Proteinqualitätskontrolle ist als flexibles Netzwerk organisiert

Zusätzlich zu den bereits bekannten Phänotypen von *surA degP* und *surA skp* ergaben sich im Rahmen dieser Arbeit weitere letale Kombinationen, bei denen *surA* eine Rolle spielt. Deletiert man zeitgleich *surA* und *tsp*, so ist der resultierende Stamm unter optimalen Wachstumsbedingungen nicht lebensfähig (siehe 4. 1. 1). Da die Doppeldeletionsmutanten *tsp degP* und *tsp skp* unter diesen Bedingungen unauffällig waren, könnte Tsp zusammen mit DegP und Skp in einem Faltungsweg organisiert sein. Die Faltung von Zellhüllproteinen wäre somit in starre Wege gegliedert. Die folgenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass es sich bei der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle um ein dynamisches System handelt.

**Abb. 5. 1: Synthetisch letale Phänotypen** unter optimalen Wachstumsbedingungen

Setzt man die Doppelmutanten Stressbedingungen (erhöhte Temperatur und/oder hyperosmolares Milieu) aus, sind die Deletionsstämme *surA dsbA*, *surA ptrA* und *surA yfgC* nicht lebensfähig (siehe 4. 1. 2.). Ein Zusammenhang von *surA* und *yfgC* wird durch die auffällige Kolonienmorphologie der entsprechenden Doppelmutante bei 43°C bestätigt (siehe Abb. 4. 5). Die Prolinisomerase SurA scheint folglich redundante Funktionen mit der Oxidoreduktase DsbA und den Metalloproteasen PtrA und YfgC zu besitzen. Außerdem erwiesen sich unter diesen Wachstumsbedingungen die Deletionsstämme *degP dsbA*, *degP ppiD*, *degP tsp*, *tsp ppiD* und *dsbA fkpA* als synthetisch letal. Daraus ergeben sich

mögliche Redundanzen der Serinprotease DegP mit der Oxidoreduktase DsbA, mit der Prolinisomerase PpiD und mit der Serinprotease Tsp. Tsp scheint ebenfalls mit PpiD in Verbindung zu stehen. Außerdem kann DsbA möglicherweise Funktionen von FkpA übernehmen (siehe Abb. 5. 2).

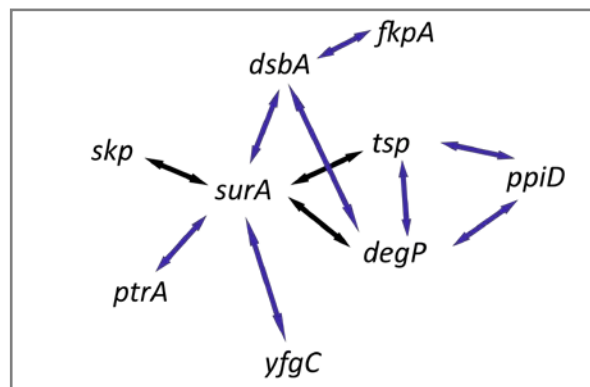


Abb. 5. 2: Synthetisch letale Phänotypen. Genetische Interaktionen unter optimalen Wachstumsbedingungen sind mit schwarzen Pfeilen, genetische Interaktionen unter Stressbedingungen sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet.

Wie bereits erwähnt, werden SurA und DegP aufgrund des letalen Phänotyps der *surA degP*-Deletionsmutante zwei unterschiedlichen Faltungswegen zugeordnet. Im Rahmen dieser Arbeit erwiesen sich zusätzlich zum *surA degP*-Doppel-KO-Stamm zwei weitere Deletionen, die in der *surA*-Mutante einen letalen Phänotyp zur Folge hatten, auch in Kombination mit einer *degP*-Nullmutation unter bestimmten Bedingungen als nicht lebensfähig (*surA dsbA*, *surA tsp* ↔ *degP dsbA*, *degP tsp*). Die Aufteilung der so identifizierten redundanten Faktoren in zwei Faltungswege ist nicht in letzter Konsequenz möglich, denn DsbA und Tsp können aufgrund ihrer genetischen Interaktionen weder in einem Faltungsweg mit SurA noch mit DegP organisiert sein. Die synthetischen Phänotypen der Deletionsstämme *degP tsp*, *degP ppiD* und *tsp ppiD* lassen eine Trennung der entsprechenden Genprodukte in zwei parallele Wege ebenfalls nicht zu. Vielmehr deuten diese Ergebnisse auf mindestens drei Organisationseinheiten innerhalb der Proteinqualitätskontrolle hin. Diese Aufteilung erscheint jedoch nicht plausibel, denn selbst wenn zwei redundante Faktoren fehlen würden, gäbe es immer noch einen dritten Faltungshelfer, der die Aufgabe der beiden anderen übernehmen könnte. Die hier beschriebenen Doppeldelusionsmutanten dürften demnach nie synthetisch letal sein. Diese Daten legen nahe, dass die Proteinqualitätskontrolle nicht in starre Faltungswege gegliedert

ist. Vielmehr scheint sie als flexibles Netzwerk organisiert zu sein, das sich, wie der nächste Abschnitt unterstreichen wird, an die jeweiligen Substrate anpassen kann. So ist es vorstellbar, dass z. B. die Deletion von SurA je nach Substrat entweder von DegP oder von Tsp ausgeglichen wird und die beiden Serinproteasen zusätzlich gemeinsame Substrate besitzen. Die Balance zwischen Spezifität und Redundanz scheint folglich eine bedeutende Rolle im Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle zu spielen.

5. 1. 2 Die Redundanz der Faltungsfaktoren ist abhängig von den Umgebungsbedingungen

Die Außenmembran schützt das Bakterium vor schädlichen Umwelteinflüssen. Ist die Membranintegrität jedoch gestört, zeigt sich das in der erhöhten Sensitivität der Mutanten gegenüber toxischen Stoffen, wie z. B. SDS/EDTA oder an der Anwesenheit periplasmatischer Proteine im umgebenden Milieu (Anderson, 1979). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten anhand von Phänotypen, die unter den oben genannten Bedingungen auftreten, weitere Faltungsfaktoren mit redundanter Funktion aufgedeckt werden.

Die Faltungsstress-sensitiven Deletionsstämme *degP dsbA* und *degP tsp* (siehe Abb. 5. 2) erwiesen sich auch unter dem Einfluss von SDS/EDTA als synthetisch letal. Für die Deletionsmutante *degP tsp* war dies zu erwarten, da ihre Bildung von Schleimkapseln zum Schutz vor Umwelteinflüssen bereits erste Hinweise auf eine defekte Außenmembran lieferte (siehe Abb. 4. 5). Desweiteren konnten die beiden Deletionsmutanten *degP yfgC* und *tsp ydgD* unter dem Einfluss von SDS/EDTA als letale Phänotypen identifiziert werden (siehe 4. 1. 3. 1). Im Vergleich zu den entsprechenden Einzeldelationen wiesen diese vier *degP*-Doppelmutanten darüber hinaus eine deutliche Aktivität des Enzyms β -Galaktosidase im Kulturüberstand auf. Aufgrund der hohen Sensitivität dieser Methode konnte zusätzlich eine bisher unentdeckte Membranschädigung in der Faltungsstress-sensitiven Deletionsmutante *dsbA fkpA* und dem Doppel-KO-Stamm *tsp fkpA* nachgewiesen werden (siehe 4. 1. 3. 2).

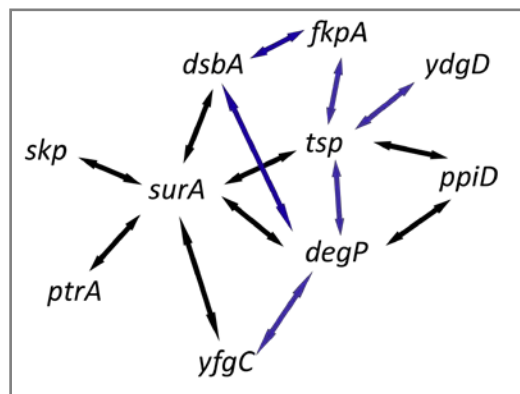


Abb. 5. 3: Synthetische Phänotypen. Alle bisher beschriebenen genetischen Interaktionen sind mit schwarzen Pfeilen und alle genetischen Interaktionen mit Einfluss auf die Membranintegrität sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet.

Der Vergleich dieser sechs Deletionsstämme mit den letalen Doppelmutanten aus Abschnitt 5. 1. 1 belegt das Modell eines Substrat-abhängigen Netzwerks der Proteinqualitätskontrolle. Nur drei Mutanten, die bereits bei Faltungsstress-assoziierten Wachstumsbedingungen letale Phänotypen aufwiesen, zeigten auch unter Einfluss von SDS/EDTA oder in Flüssigkultur Membrandefekte (*degP dsbA*, *degP tsp*, *dsbA fkpA*). Alle anderen im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten genetischen Interaktionen sind ausschließlich unter einer bestimmten Wachstumsbedingung von Bedeutung. Die Veränderung von Wachstumsbedingungen modifiziert die Anforderungen an die Proteinqualitätskontrolle, denn durch die Anpassung an das umgebende Milieu werden Proteine verstärkt exprimiert, falsch gefaltet oder abgebaut. Die Faltungsfaktoren, die für das Überleben der Zelle essentiell sind, variieren folglich in Abhängigkeit der Umweltbedingungen, weil sich die Proteinqualitätskontrolle an die unter den jeweiligen Bedingungen vorliegenden Substrate anpasst.

Die Aufgaben der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle werden bis heute ausschließlich anhand von Außenmembranproteinen diskutiert. Erste Hinweise belegen jedoch, dass einige Faltungsfaktoren z. B. auch in die Biogenese von Innenmembranproteinen involviert sind. So ist das erste native Substrat, das für Tsp beschrieben wurde, das Innenmembranprotein PBP 3 (Hara, 1989) und das instabile, artifizielle Innenmembranprotein Tsr-AP 2 wird in *degP*-Nullmutanten nicht abgebaut (Strauch & Beckwith, 1988). Außerdem konnten Kihara und Ito zeigen, dass das Transmembranprotein HflK in *degP*-Mutanten nicht und in *tsp*-Mutanten nur unvollständig

abgebaut wird (Kihara & Ito, 1998). Tatsächlich lieferte die Aktivitätsbestimmung cytoplasmatischer β -Galaktosidase im Kulturüberstand von Deletionsmutanten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, nicht nur Erkenntnisse zu Faltungsfaktoren mit redundanter Funktion, sondern auch deutliche Hinweise auf Schädigungen der Innenmembran (siehe 4. 1. 3. 2). Diese Ergebnisse belegen erstmals, dass zusätzlich zu DegP und Tsp weitere Faktoren der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle nicht nur die Integrität der Außen-, sondern auch der Innenmembran maßgeblich beeinflussen. Weitere Versuche sind allerdings notwendig, um die direkte Beteiligung der Faktoren an der Faltung einzelner Innenmembranproteine im Detail aufzuklären und um mögliche Sekundäreffekte als Ursache der geschädigten Membranintegrität definitiv ausschließen zu können.

5. 2 SurA, DegP, Tsp und DsbA sind Schlüsselemente der Proteinqualitätskontrolle

Die Bedeutung der in Abschnitt 5. 1 vorgestellten genetischen Interaktionen für die Proteinqualitätskontrolle wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von *Phenotype microarrays* (PMs) und qRT-PCR-Analysen genauer charakterisiert. Die 7 redundanten Paarungen, die sich in diesen Untersuchungen als maßgeblich für die Proteinfaltung erwiesen, legen Schlüsselfunktionen für die Prolinisoмерase SurA, die Serinproteasen DegP und Tsp, sowie die Oxidoreduktase DsbA nahe und werden daher in den folgenden Abschnitten detaillierter erläutert.

PMs ermöglichen die Analyse von ca. 2000 unterschiedlichen Wachstumsbedingungen pro KO-Stamm und zeigen auf diese Weise Funktionen der deletierten Gene auf (Bochner, 2001). So konnte z. B. die Hypothese, dass das Bae-Zweikomponentensystem u. a. in der Regulation einer Effluxpumpe involviert ist, durch die erhöhte Sensitivität von *baeRS*-Deletionsstämmen gegenüber Gallensäuren, Nickelchlorid und Natriumwolframat in PM-Analysen bestätigt werden (Zhou, 2003). Zudem ergab die Charakterisierung von 4000 Deletionsstämmen anhand ihrer Antibiotikasuszeptibilität, wie sie in den PMs Anwendung findet, dass alle Stämme, die sensitiv auf mehrere Antibiotika reagierten, u. a. Defekte in Effluxsystemen (z. B. *tolC*) oder der Membranbiogenese (z. B. *bamB*, *bamE*) aufwiesen (Tamae, 2008). Dementsprechend bestätigen die Ergebnisse der PMs, die im Rahmen dieser Arbeit

durchgeführt wurden, die Membrandefekte für mehrere Mutanten, wie z. B. für die Deletionsmutanten *degP dsbA* und *degP tsp* (siehe 4. 2. 1).

Die Sensitivität der *degP dsbA*-Deletionsmutante gegenüber toxischen Substanzen, die in den PMs gemessen wurde, beschränkte sich nicht nur auf eine bestimmten Stoffgruppe, sondern verursachte pleiotrope Effekte. Die Eingrenzung auf Defekte einer speziellen Effluxpumpe oder eines Membranrezeptors ist somit nicht möglich. Vielmehr lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass die Doppeldeletion möglicherweise globale Auswirkungen hat, die die Integrität der Außenmembran stören. Alternativ könnten Enzyme, die die Lipidzusammensetzung steuern, durch Faltungsdefekte negativ beeinflusst werden. Die Daten der qRT-PCR-Analyse unterstreichen dieses Ergebnis, denn die Cpx- bzw. Bae-Antwort ist im *degP dsbA*-Deletionsstamm als Folge von Faltungsstress im Vergleich zu den Einzelmутanten deutlich erhöht (siehe 4. 2. 2. 2). Eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang von DegP und DsbA im Rahmen der Proteinqualitätskontrolle wird durch Studien in *Rhodobacter capsulatus* aufgezeigt (Önder, 2008). In diesem Bakterienstamm erwies sich eine *degP dsbA*-Nullmutante auch unter optimalen Wachstumsbedingungen als synthetisch letal. Dennoch gelang es Önder *et al.* eine chromosomale Doppelmutante zu generieren, indem DsbA *in trans* zu Verfügung gestellt wurde. Im Gegensatz dazu reichte die Expression einer inaktiven DegP-Mutante nicht aus, um die Lebensfähigkeit der Zelle zu sichern. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass DegP möglicherweise fehlgefaltete DsbA-Substrate abbauen kann, um so das Überleben der Zelle zu gewährleisten. Es würde sich bei DegP und DsbA folglich nicht um eine funktionelle, sondern um eine substratspezifische Redundanz handeln.

Eine funktionelle Redundanz scheint DegP hingegen mit der Serinprotease Tsp zu verbinden. Beide Proteine besitzen PDZ-Domänen, die spezifische Substrate erkennen und binden (Beebe, 2000). Die PDZ-Domäne von Tsp erkennt u. a. den sogenannten *ssrA-tag* (AANNENYALAA). Diese 11 Aminosäuren markieren defekte Polypeptide, denen ein verkürztes RNA-Transkript ohne Stoppcodon zugrunde liegt (Keiler, 1996b). Auch die PDZ-Domänen von DegP binden denaturierte Proteine effizienter, wenn diese C-terminal durch einen *ssrA-tag* markiert sind. So sequestriert DegP ungefaltetes EGFP besser, wenn es z. B. einen *ssrA-tag* besitzt (Iwanczyk, 2007). Außerdem scheint die Degradation des Innenmembranproteins HflK, wie bereits erwähnt, sowohl von DegP als auch von Tsp

abhängig zu sein (Kihara & Ito, 1998). Die Redundanz von DegP und Tsp wird durch die genetische Interaktion von *degP* und *tsp* belegt, die im Rahmen dieser Arbeit aufgedeckt wurde. So zeigen die Ergebnisse der PMs, dass die Deletionen im *degP tsp*-KO-Stamm globale Auswirkungen haben. Obwohl bereits die Einzeldelation des Gens *tsp* zu einem reduzierten Wachstum unter Zusatz von Antibiotika, Detergenzien und anderen toxischen Substanzen führte, scheinen die durch Abwesenheit von Tsp auftretenden Faltungsdefekte minimal zu sein. Die Analyse mittels qRT-PCR ergab, dass die Stressantwort in der *tsp*-Einzelmutante nicht aktiviert war. Erst die kombinierte Deletion von *degP* und *tsp* aktiviert die Cpx- bzw. Bae-Antwort und zusätzlich den σ^E -Signalweg. Dieser Stamm akkumuliert folglich fehlgefaltete Proteine. Die Faltungsdefekte dieses Stamms werden durch die PMs bestätigt (siehe 4. 2. 1 und 4. 2. 2). Sie zeigen, dass die Doppelmutante mehrere Kohlenstoff- und Stickstoffquellen nicht nutzen kann. Bekannte Mutanten mit ähnlichen Phänotypen weisen Deletionen auf, die ausschließlich cytoplasmatische Schlüsselemente der Glykolyse, des Zitronensäurezyklus oder des Pentosephosphatwegs betreffen (Tohsato & Mori, 2008). Im Zusammenhang mit periplasmatischen Faltungsfaktoren sind noch keine Stoffwechselmutanten beschrieben. Einen möglichen Hinweis auf die Ursache dieser Phänotypen könnte die Studie von Anderson *et al.* liefern. Sie beschreibt eine Mutante mit gestörtem Leucin-Transport, deren Hypersensitivität gegenüber Detergenzien, EDTA und diversen Antibiotika zusätzlich eine Schädigung der Außenmembran belegt. Detaillierte Untersuchungen an der Mutante ergaben schließlich, dass das Leucin-Bindeprotein LIV-I aufgrund der defekten Außenmembran in das umgebende Milieu gelangt war und somit kein Leucin-Transport stattfinden konnte (Anderson, 1979). Die *degP tsp*-Deletionsmutante weist ebenfalls starke Membrandefekte auf, die sogar zum Verlust cytoplasmatischer β -Galaktosidase führt. Der Deletionsstamm könnte während seines Wachstums periplasmatische Bindeproteine verlieren, die eigentlich für die Aufnahme und den Transport von Nährstoffen verantwortlich sind. Möglicherweise ist aber auch die korrekte Faltung dieser Bindeproteine sowohl von DegP als auch von Tsp abhängig. Die Funktionalität der Bindeproteine wäre damit ohne die beiden Faltungsfaktoren nicht gewährleistet.

Die untersuchten *surA*-Doppel-KO-Stämme erwiesen sich in den PMs ebenfalls als interessant. Die beiden Deletionsmutanten *surA ptrA* und *surA yfgC* zeigten zwar im Gegensatz zur *degP tsp*-Deletionsmutante kaum bzw. keine Auffälligkeiten bezüglich ihres

Kohlenstoffmetabolismus, doch unter allen anderen Stoffwechsel-assoziierten Bedingungen war das Wachstum der beiden Stämme stark reduziert. Der *surA yfgC*-Doppel-KO-Stamm wies erwartungsgemäß keine und die *surA ptrA*-Deletionsmutante nur leichte Membrandefekte auf, die allerdings in ähnlicher Form schon bei der *surA*-Einzelmutante zu finden waren. Der Verlust periplasmatischer Bindeproteine als Ursache der Stoffwechseldefekte in den Doppelmутanten kann daher ausgeschlossen werden. Vielmehr scheinen SurA und PtrA bzw. YfgC bei der Faltung von periplasmatischen Bindeproteinen eine bedeutende Rolle zu spielen. Die Deletionsmutante *surA dsbA* ist in den PMs unter allen getesteten Bedingungen als synthetisch letal zu betrachten. Die im Rahmen dieser Arbeit bereits diskutierte Redundanz von SurA und DsbA unter stress-assoziierten Wachstumsbedingungen lässt sich hiermit bestätigen.

Das Ausmaß der Faltungsdefekte in den *surA*-Doppeldeletionsmutanten konnte mit Hilfe der Cpx/Bae- bzw. der σ^E -Stressantwort nicht näher charakterisiert werden (siehe 4. 2. 2. 1). Die Bedeutung der genetischen Interaktion von *dsbA* und *fkpA* bzw. *tsp* und *ydgD* für die Proteinqualitätskontrolle konnte hingegen mittels qRT-PCR bestätigt werden, obwohl sich die beiden Deletionsstämme *dsbA fkpA* und *tsp ydgD* in den PMs kaum von den korrespondierenden Einzelmutanten unterschieden. Die *rpoE*- und *spy*-Expressionsprofile zeigten deutlich, dass die Stressantwort aufgrund von Faltungsdefekten in diesen Mutanten aktiviert ist. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse sind besonders für YdgD interessant. Diese Protease ist bisher uncharakterisiert, die hier gewonnenen Daten belegen erstmals eine Rolle von YdgD in der allgemeinen Proteinqualitätskontrolle.

Die hier diskutierten Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der genetischen Interaktionen von *degP dsbA*, *degP tsp*, *surA dsbA*, *surA ptrA*, *surA yfgC*, *dsbA fkpA* und *tsp ydgD* für die Proteinqualitätskontrolle und beleuchten somit wichtige Zweige des flexiblen Faltungsnetzwerks. Zudem belegen die Ergebnisse Schlüsselrollen für SurA, DegP, Tsp und DsbA in Proteinfaltungsprozessen, denn an jedem Phänotyp, der auf deutliche Faltungsdefekte hinweist, ist eine Nullmutation entweder in *surA*, *degP*, *tsp* oder *dsbA* beteiligt. Es ist denkbar, dass diese vier Faltungsfaktoren als zentrale Elemente die einzelnen Zweige des Faltungsnetzwerks miteinander verbinden. Da *surA* an den meisten genetischen Interaktionen beteiligt ist, besitzt die Prolinisomerase sicherlich die wichtigste

Schlüsselfunktion, gefolgt von DegP und Tsp bzw. DsbA.

5. 3 Substrate der Proteinqualitätskontrolle

Die Charakterisierung der untersuchten Deletionsstämme beweist deutlich, dass die Mutanten schwerwiegende Defekte in Innen- und Außenmembran besitzen und möglicherweise auch periplasmatische Proteine von Faltungsdefekten betroffen sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daraufhin die Expressionsmuster verschiedener Proteine aus Innen- bzw. Außenmembran und Periplasma in den 11 Deletionsstämmen mit synthetischem Phänotyp (siehe 5. 1) analysiert, um Redundanzen innerhalb der Proteinqualitätskontrolle konkret diskutieren zu können. Auf diese Weise wurden 39 von insgesamt ca. 450 Proteinen der Zellhülle (Ecce Database) untersucht.

Mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnten die Außenmembranproteine FhuA, OmpW und LamB als Substrate von *degP*-Doppelmutanten identifiziert werden (siehe 4. 3). Der Siderophor-Transporter FhuA ist an der Aufnahme von Eisen beteiligt. Das monomere Protein bildet zwei Disulfidbrücken aus. Die Wahrscheinlichkeit, dass FhuA ein Substrat von DsbA ist, ist damit sehr hoch. Tatsächlich war die Proteinmenge des Transporters in der *dsbA*-Mutante stark reduziert. Die Abwesenheit von DsbA führt vermutlich zur Fehlfaltung und zum verstärkten Abbau von FhuA. Die qRT-PCR-Analyse, welche eine Regulation auf RNA-Ebene ausschloss, bestätigte diese Daten (siehe 4. 3. 1. 1). Interessanterweise blieb die FhuA-Menge in der *dsbA degP*-Deletionsmutante unverändert. Möglicherweise ist die Ursache für dieses Phänomen eine Suppressormutation. Durch die Akkumulation von Defekten wächst der Selektionsdruck in diesem Stamm und Mutationen, die den konditionellen Phänotyp komplementieren, werden begünstigt.

Im Vergleich zur *dsbA*-Einzelmutante war die FhuA-Menge im *degP ppiD*-Doppel-KO-Stamm noch drastischer reduziert (siehe Abb. 4. 18). Die verringerte FhuA-Konzentration in der Außenmembran ließe sich durch einen Rückkopplungsmechanismus erklären, der die Expression von *fhuA* aufgrund von akkumuliertem Protein reprimiert. Da sich bei der qRT-PCR-Analyse jedoch keine Regulation auf RNA-Ebene zeigte, kann dieser Mechanismus als Ursache ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist hier die Beteiligung von DegP als Chaperon: DegP kann die Abwesenheit von PpiD ausgleichen, indem es FhuA bei der Faltung assistiert. Fehlen jedoch beide Faltungshelfer, kann FhuA seine korrekte Konformation nicht

einnehmen und wird nicht in die Außenmembran eingebaut. Der *degP ppiD*-Deletionsstamm war in den PMs und den qRT-PCR-Analysen bisher unauffällig (siehe 4. 2. 1 und 4. 2. 2). Die Interaktion von DegP und PpiD hat also keinen Einfluss auf eine Vielzahl von Außenmembranproteinen, deren Fehlfaltung starke Defekte zur Folge hätte. Vielmehr überschneiden sich die Funktionalität bzw. die Spezifität von DegP und PpiD nur für wenige Substrate.

DegP hat darüber hinaus erwartungsgemäß gemeinsame Substrate mit Tsp. Im Doppel-KO-Stamm *degP tsp* war die Menge von OmpW, einem monomeren Außenmembranprotein unbekannter Funktion (Hong, 2006), reduziert (siehe Abb. 4. 20). Die Untersuchung von LamB-Faltungsintermediaten (siehe 4. 3. 2. 1) macht den Zusammenhang von DegP und Tsp zusätzlich deutlich. Diese Analyse ergab eine Anhäufung von ungefaltetem LamB-Monomer im *degP tsp*-Deletionsstamm. Misra *et al.* konnten zeigen, dass in einem *degP*-KO-Stamm bei 42°C LamB-Monomer akkumuliert (Misra, 1991). Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen nun, dass die Deletion von DegP bei 37°C durch eine weitere Protease (Tsp) ausgeglichen werden kann. Fehlen jedoch beide Proteine, kann ungefaltetes LamB im Periplasma nicht mehr abgebaut werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen der *degP tsp*-Deletionsmutante (siehe 5. 2) legen redundante Funktionen von DegP und Tsp in der Proteinqualitätskontrolle nahe, die nun durch die Identifizierung gemeinsamer Substrate eindeutig belegt werden können.

Interessanterweise scheint die Rolle von DegP je nach Substrat zu variieren. So wird die Integration von FhuA im *degP ppiD*-KO-Stamm durch die Deletionen verhindert, LamB wird in der *degP tsp*-Deletionsmutante jedoch in gleichen Mengen wie im Wildtyp in die Außenmembran eingebaut, obwohl ungefaltetes LamB-Monomer in dieser Mutante akkumuliert (vgl. Abb. 4. 18, 4. 23 und 4. 24). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen lieferte die Analyse von Faltungsintermediaten im *degP dsbA*-Deletionsstamm. Sie belegte, dass auch in diesem Stamm ungefaltetes LamB-Monomer akkumuliert. Zusätzlich zeigten die Western Blots der vorliegenden Arbeit, wie auch die Daten von Vertommen *et al.* (2009), leicht reduzierte LamB-Mengen in der Außenmembran von *dsbA*-Deletionsstämmen. Diese Ergebnisse bestätigen LamB als Substrat der Oxidoreduktase und unterstreichen den bereits diskutierten Zusammenhang von DegP und DsbA: DegP ist im Rahmen der Proteinqualitätskontrolle offensichtlich dafür zuständig fehlgefaltete DsbA-Substrate abzubauen, um eine

Schädigung der Zelle zu verhindern. Möglicherweise ist DegP aber auch in der Lage, bei niedrigen Temperaturen die Rückfaltung der Substrate zu unterstützen, wie Untersuchungen an MaIS (einer α -Amylase mit zwei Disulfidbrücken), nahelegen. Spiess *et al.* konnten zeigen, dass die korrekte Faltung der α -Amylase sowohl von DsbA als auch von DegP abhängig ist. Bei niedrigen Temperaturen konnte DegP die Faltung von MaIS positiv beeinflussen, bei erhöhten Temperaturen wurde die α -Amylase von DegP abgebaut (Spiess, 1999). Die Ergebnisse zu FhuA und LamB, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden (siehe 4. 3. 1. 1 und 4. 3. 2. 1), erfordern nun eine Erweiterung dieses Modells. Möglicherweise ist der Wechsel von Protease- zur Chaperonfunktion nicht nur von der Temperatur, sondern auch vom jeweiligen Substrat abhängig. DegP würde demnach die Faltung von FhuA als Chaperon unterstützen, ungefaltetes LamB würde jedoch von DegP abgebaut. Die Tatsache, dass im Zusammenhang mit LamB die Proteasefunktion von DegP von Bedeutung ist, wird durch die Analyse des Doppeldeletionsstamm *degP yfgC* zusätzlich deutlich. Fehlen die beiden Proteasen DegP und YfgC, wird ungefaltetes LamB nicht mehr abgebaut und häuft sich im Periplasma an (siehe Abb 4. 23).

Diese Ergebnisse entsprechen dem Modell eines flexiblen Netzwerks, das sich an das jeweilige Substrat anpasst und unterstreichen somit die im Rahmen dieser Arbeit aufgestellte These zur Organisation der Proteinqualitätskontrolle. Darüber hinaus sind die Daten der Expressionsanalysen für YfgC interessant, denn für die uncharakterisierte Protease wurden noch keine nativen Substrate beschrieben. Die Beteiligung an der Degradation von LamB ist somit der erste Hinweis auf mögliche Aufgaben von YfgC in der Proteinqualitätskontrolle.

Durch die Akkumulation des ungefalteten LamB in den drei *degP*-Doppelmutanten (*degP dsbA*, *degP tsp* und *degP yfgC*) kommt es interessanterweise zu keiner Änderung der LamB-Gesamtzellkonzentration. Auch die Menge an LamB in der Außenmembran unterscheidet sich, wie bereits erwähnt, in den Doppelmutanten nicht vom Wildtyp (siehe 4. 3. 2. 1). Diese Daten zeigen, dass die angehäuften LamB-Mengen im Rahmen der Zellhomöostase unter optimalen Wachstumsbedingungen trotz deletierter Faltungsfaktoren in diesen Mutanten toleriert werden können und das Protein in normalen Mengen in die Außenmembran eingebaut wird.

SurA-Einzelmutanten haben reduzierte Mengen der Außenmembranproteine OmpA, LamB,

OmpF und OmpC, wie mehrere Studien belegen (Rouvière, 1996; Lazar, 1996; Sklar, 2007a). Zusätzlich konnten Vertommen *et al.* zeigen, dass LptD und FhuA Substrate von SurA sind (Vertommen, 2009). Erwartungsgemäß konnten LamB und FhuA in den *surA*-Deletionsmutanten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, nicht oder nur in geringen Mengen nachgewiesen werden (siehe 4. 3. 1. 1 und 4. 3. 2. 2). Die Expressionsmuster der *surA*-Doppelmutanten entsprachen dabei immer der *surA*-Einzelmutante. Eine Ausnahme stellte die Expressionsanalyse von OmpW dar. Die Menge von OmpW war in der *surA*-Einzelmutante zwar reduziert, lag aber noch deutlich über der Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu war auf den Western Blots der beiden Doppel-KO-Stämme *surA ptrA* und *surA yfgC* kein OmpW mehr zu erkennen (siehe Abb. 4. 20). Die verringerte OmpW-Menge in der *surA*-Einzelmutante ist wahrscheinlich auf die niedrige RNA-Menge zurückzuführen, die in diesem Stamm für OmpW gemessen wurde. Die Repression auf Translationsebene kann als Ursache der reduzierten OmpW-Konzentration in den beiden *surA*-Doppelmutanten ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da sie nicht mittels qRT-PCR analysiert werden konnten. Dennoch scheint ein Zusammenhang von SurA und PtrA bzw. YfgC auf Proteinebene möglich, denn die OmpW-Menge war nur in den beiden *surA*-Doppelmutanten deutlich reduziert, die auch in den PMs identische Muster aufwiesen. Entsprechend dem Modell von Rizzitello wäre SurA demnach maßgeblich an der Faltung von OmpW beteiligt und nur die Zusammenarbeit von PtrA und YfgC könnte die Deletion von *surA* kompensieren.

Die Identifikation von Substraten der Proteinqualitätskontrolle im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt redundante Funktionen von DegP/PpiD, DegP/Tsp DegP/DsbA, DegP/YfgC SurA/PtrA und SurA/YfgC auf Proteinebene und trägt damit einen wichtigen Teil zur Verifikation der bisherigen Ergebnisse bei. Globale Untersuchungen zur Substratfindung sollten daher ein unerlässlicher Bestandteil zukünftiger Analysen sein. Möglicherweise können diese ausgedehnten Untersuchungen den Zusammenhang von Tsp mit PpiD, FkpA bzw. YdgD und von DsbA mit FkpA klären, der im Rahmen dieser Arbeit zwar aufgedeckt, aber nicht näher spezifiziert werden konnte.

5. 4 Chaperonaktivität von DegP, Tsp und YfgC

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen von OmpW und LamB werfen die Frage nach einer möglichen Chaperonfunktion von Tsp und YfgC auf. Komplementationsstudien, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnten erste Hinweise zur ihrer Beantwortung liefern (siehe 4. 4). Rekonstituiertes Tsp kann in der Deletionsmutante *degP tsp* sowohl mit aktiver als auch mit inaktiver Proteasefunktion das Überleben der Zelle bei erhöhten Temperaturen sichern und bewirkt unter hyperosmolaren Bedingungen in beiden Fällen sogar ein Wildtyp-ähnliches Wachstum. Die *surA yfgC*-Deletionsmutante wächst bei 42°C durch die rekonstituierte Expression von YfgC fast genauso gut wie der Wildtypstamm und selbst die Komplementation mit einer Protease-defizienten YfgC-Variante reicht aus, um das Wachstum annähernd zu normalisieren.

Diese Daten unterstreichen eine mögliche Chaperonfunktion von Tsp und YfgC, die jedoch durch weitere Versuche (z. B. Rückfaltungsexperimente) eindeutig bestätigt werden muss. Dennoch erscheint dieser Versuch ein guter Indikator zu sein, denn die unterschiedlichen Funktionen von DegP in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur, wie sie von Spiess *et al.* beschrieben wurden, konnten durch diesen Versuchsteil bestätigt werden. Die rekonstituierte Expression von DegP in den Nullmutanten *degP dsbA* und *degP tsp* führte erwartungsgemäß trotz Temperaturen von 42°C zu einem Wildtyp-ähnlichen Wachstum. In dem *degP tsp*-Doppel-KO-Stamm wird jedoch deutlich, dass eine Protease-defiziente Variante von DegP das Überleben der Zelle bei erhöhten Temperaturen nur in geringem Maß sichern kann. Die Defekte, die in hyperosmolarem Medium bei 37°C für das schlechte Wachstum der Zelle relevant sind, können von DegP und der DegP-SA-Variante hingegen gleichermaßen gut kompensiert werden, d. h. unter diesen Bedingungen ist die Chaperonaktivität ausreichend.

5. 5 Potentielles Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle im Periplasma

Die Biogenese von LamB und FhuA, die im Folgenden kurz erläutert wird, soll exemplarisch die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Zusammenhänge von Faltungsfaktoren verdeutlichen. Die korrekte Faltung des Außenmembranproteins LamB ist unter optimalen Wachstumsbedingungen von der Oxidoreduktase DsbA und der Prolinisomerase SurA abhängig (siehe Abb. 5. 4). Sklar *et al.* konnten mit Hilfe von *in-vivo-crosslinks* zeigen, dass SurA direkt mit BamA (siehe 1. 3. 2) interagiert (Sklar, 2007a). Da BamA maßgeblich an der

Integration von Proteinen in die Außenmembran beteiligt ist (Robert, 2006), bindet LamB möglicherweise zuerst DsbA, das die Bildung seiner Disulfidbrücke katalysiert, um anschließend unter Beteiligung von SurA über den BAM-Komplex in die Außenmembran zu integrieren. Das monomere FhuA benötigt für seine Biogenese zusätzlich die Prolinisomerase PpiD. Da die Interaktion des membranständigen PpiD mit translozierenden Proteinen nachweislich die Freisetzung neu synthetisierter Proteine vom SecYEG-Translocon begünstigt (Antonoaea, 2008), bindet FhuA wahrscheinlich zuerst an diese Prolinisomerase bevor es mit DsbA und SurA interagiert. Sind die primären Faltungswege defekt, wird un- bzw. fehlgefaltetes LamB von den Proteasen DegP, Tsp und YfgC abgebaut und auch FhuA wird von DegP beeinflusst. Das monomere Außenmembranprotein wird jedoch nicht von der Protease degradiert, sondern seine Faltung durch die Chaperonaktivität von DegP unterstützt.

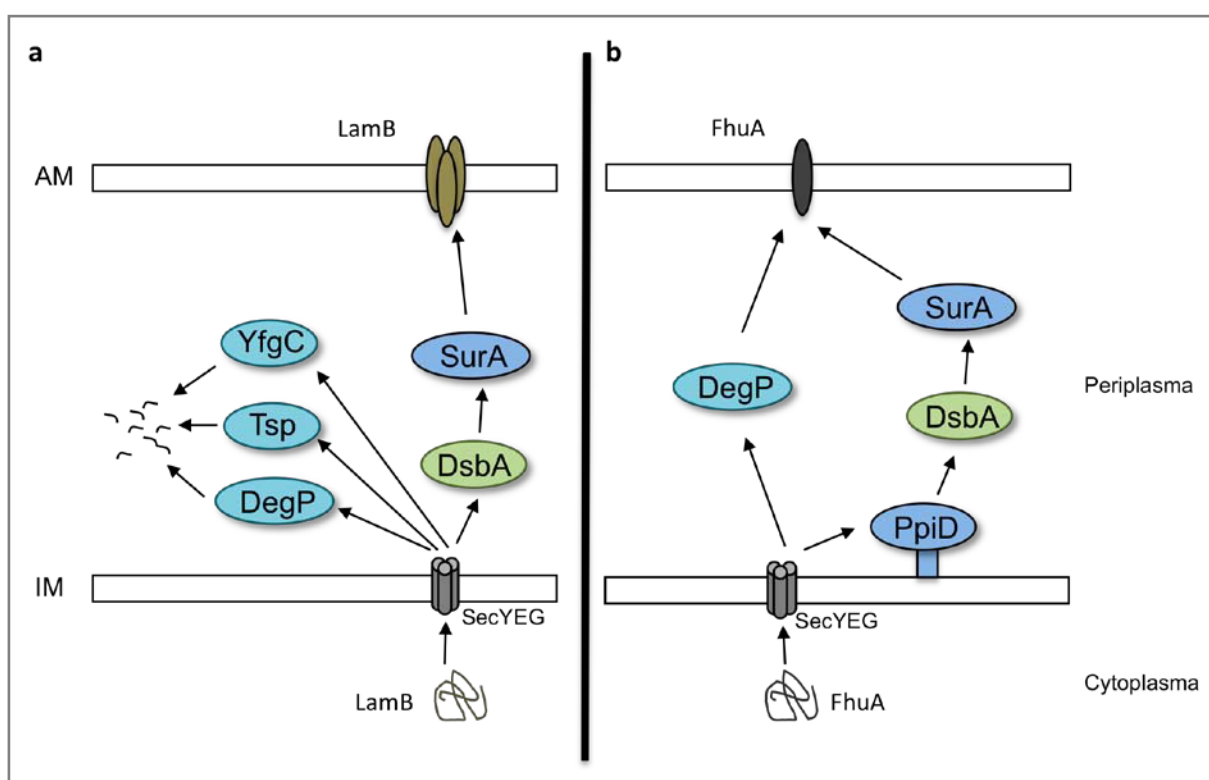


Abb. 5. 4: Potentieller Faltungsweg von a) LamB und b) FhuA im Rahmen des Netzwerks der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle. Prolinisomerasen sind in blau, Oxidoreduktasen in grün und Proteasen in türkis dargestellt.

Die in der vorliegenden Arbeit postulierte These, dass sich die Proteinqualitätskontrolle im Rahmen eines Netzwerks flexibel an Substrate anpasst, wird durch diese Beispiele veranschaulicht. Weitere biochemische Analysen, wie die folgende vergleichende Charakterisierung von DegP und Tsp und Studien der Membraninsertion unter verschiedenen Stressbedingungen, wären jedoch notwendig, um dieses Modell näher zu untersuchen.

5. 6 DegP und Tsp haben *in vitro* redundante Funktionen

5. 6. 1 DegP und Tsp haben gemeinsame Substrate

Eine redundante Funktion von DegP und Tsp wurde erstmals in der Untersuchung von Kihara und Ito aufgezeigt, die eine Beteiligung sowohl von DegP als auch von Tsp an der Degradation des Innenmembranproteins HflK beschreibt (Kihara & Ito, 1998). Die Analysen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen ebenfalls ähnliche Funktionen der beiden Serinproteasen DegP und Tsp auf. Da sich die vorliegenden Daten ausschließlich auf die Charakterisierung von Deletionsmutanten beziehen, sollte der Zusammenhang von DegP und Tsp auf Proteinebene genauer untersucht werden. Die vergleichenden biochemischen Analysen der beiden Serinproteasen ergeben erste Hinweise zu Redundanz und Spezifität der Proteine.

Bovines β -Casein ähnelt aufgrund fehlender Sekundärstrukturen denaturierten Polypeptiden, die *in vivo* potentielle Substrate für DegP darstellen. Tatsächlich ist β -Casein ein gut untersuchtes Modellsubstrat von DegP und wurde daher für einen Vergleich der proteolytischen Aktivitäten von DegP und Tsp herangezogen. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigen, dass Tsp, wie DegP, in der Lage ist β -Casein abzubauen (siehe 4. 5. 2). Da es sich bei β -Casein jedoch um ein unspezifisches und artifizielles Substrat handelt, wurde ein weiterer Verdau mit RseA durchgeführt. Der σ^E -Regulator RseA ist möglicherweise ein natives Substrat von DegP. Untersuchungen *in vitro* haben gezeigt, dass die Protease den durch DegS ins Periplasma freigesetzten C-Terminus von RseA vollständig abbaut. DegP kann darüber hinaus noch einen weiteren distinkten Schnitt durchführen, der möglicherweise regulatorische Wirkung hat. Der initiale Schnitt in der proteolytischen Kaskade der σ^E -abhängigen Stressantwort zwischen den Aminosäuren Valin 148 und Serin 149 wird normalerweise von der Protease DegS durchgeführt. Doch auch DegP scheint in der Lage,

RseA an dieser Stelle zu schneiden (Hasenbein, 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde keine detaillierte Charakterisierung der Proteolysefragmente von Tsp durchgeführt, eine Aussage über spezielle Schnittstellen kann daher nicht getroffen werden. Dennoch ergab der vergleichende Verdau des σ^E -Regulators durch DegP und Tsp, dass RseA sowohl ein Substrat von DegP als auch von Tsp ist. Eine redundante Funktion von DegP und Tsp wird somit im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in vitro* bestätigt.

Aktivitätstests mit einem pNA-Substrat (DPMFKLV-pNA), das speziell für Untersuchungen an DegP entwickelt wurde (Hauske, 2009), erlauben eine genauere Spezifikation dieser Redundanz. Auch das pNA-Substrat kann von DegP und Tsp umgesetzt werden, allerdings unterscheiden sich die beiden Serinproteasen deutlich in ihren spezifischen Aktivitäten (siehe 4. 5. 3). Die Aktivitätstests werfen außerdem Fragen zur Regulation von Tsp auf, die für DegP schon beantwortet werden konnten. Die Bindung eines Peptids an eine der PDZ-Domänen von DegP bewirkt eine Konformationsänderung des Enzyms und erhöht damit die Peptidaseaktivität seiner katalytischen Domäne. DegP wird also allosterisch aktiviert und da das gebundene Peptid zeitgleich auch ein Substrat sein kann, verstärkt der Ligand seine eigene Degradation (Krojer, 2008). Das Protein β -Casein ist als allosterischer Ligand von DegP bereits beschrieben (Dissertation M. Meltzer, 2008). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich auch Tsp durch die Zugabe von β -Casein aktivieren lässt. Möglicherweise wird Tsp ebenfalls allosterisch reguliert.

5. 6. 2 Die PDZ-Domänen von DegP und Tsp haben ähnliche Bindungspartner

Eine weitere Gemeinsamkeit der beiden Serinproteasen lieferte die Identifikation potentieller Bindungspartner der PDZ-Domänen von DegP und Tsp. Es zeigte sich, dass beide Proteasen mit hoher Wahrscheinlichkeit an unpolare, hydrophobe Aminosäuren binden und tatsächlich existieren drei Peptide, die von beiden Proteinen gleichermaßen gebunden werden können (siehe 4. 5. 4). Da für Tsp, im Gegensatz zu DegP, nur wenige Bindungspartner gefunden wurden, soll eine zweite Analyse unter optimierten Versuchsbedingungen weitere Bindungspartner der PDZ-Domäne von Tsp aufzeigen. Möglicherweise lassen sich dadurch zusätzlich native Substrate von Tsp identifizieren, die auch von DegP erkannt werden. Auch wenn die vorliegenden Daten keinen exakten Vergleich der Substratspezifität zulassen, scheinen sie dennoch zu bestätigen, dass Tsp und

DegP in einem bestimmten Maß ähnliche Funktionen besitzen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden durch Untersuchungen von Spiers *et al.* unterstützt. Dort wurde gezeigt, dass die PDZ-Domänen von DegP und Tsp an *ssrA-tags* binden können, markierte Modellsubstrate aber unterschiedlich effektiv abgebaut werden (Spiers, 2002).

5. 7 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Daten gewonnen werden, die erste Hinweise auf ein potentes Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle liefern. Ziel zukünftiger Untersuchungen sollte sein, die Organisation des Netzwerks detaillierter aufzuklären, zu verifizieren und weiter auszubauen.

Ein wichtiger Schritt ist daher die globale Analyse der Deletionsstämme zur Identifizierung weiterer nativer Substrate. In Zusammenarbeit mit einem unserer Kooperationspartner soll die Proteinzusammensetzung der Zellhülle in ausgewählten Mutanten mittels massenspektrometrischer Methoden untersucht werden. Dabei sind im Vergleich zum Wildtypstamm über- oder unterrepräsentierte Proteine interessant. Proteine, deren Expression nur in den Doppeldeletionsstämmen, nicht aber in den korrespondierenden Einzelmутanten verändert ist, stellen potentielle Substrate dar und belegen den Zusammenhang der deletierten Faktoren.

Die so ermittelten Substrate können dann für Rückfaltungs- und Proteolysetests *in vitro* herangezogen werden. Die Rückfaltung bzw. Degradation verschiedener Proteine wird in Anwesenheit von Faltungsfaktoren durchgeführt, die sehr wahrscheinlich Bestandteil eines bestimmten Netzwerkzweigs sind. Die Effekte der beteiligten Faktoren sollten synergistisch sein, wenn sie tatsächlich dem gleichen Faltungsweg angehören. Auf diese Weise kann das Zusammenwirken mehrerer Faltungsfaktoren verifiziert werden. Interessant wäre sicherlich auch, die Rückfaltungstests mit inaktiven Proteasen durchzuführen. Die so gewonnenen Daten könnten die potentielle Chaperonaktivität von Tsp und YfgC bestätigen. Zusätzlich würde dieser Versuch zeigen, welche Substrate die Chaperon- bzw. die Enzymaktivität eines Faltungsfaktors unter verschiedenen Umgebungsbedingungen benötigen.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestätigung von redundanten Funktionen ist die vergleichende biochemische Charakterisierung von Faltungsfaktoren, wie sie für DegP und Tsp im Rahmen dieser Arbeit bereits begonnen wurde. Weiterführende Experimente sollten Aktivitätstests

unter verschiedenen Pufferbedingungen mit einschließen, denn die Serinprotease Tsp ist in früheren Studien nicht detailliert charakterisiert worden. Unter optimierten Bedingungen kann dann z. B. mittels ITC (Isothermale Titrationskalorimetrie) die Bindungsaffinität von Tsp an bestimmte Substrate im Vergleich zu DegP bestimmt werden. Diese Methode bietet sich darüber hinaus auch zur Analyse weiterer Faltungsfaktoren an, die potentiell redundante Funktionen besitzen.

Einige Daten der vorliegenden Arbeit weisen auf die Expression von Suppressorgenen in einzelnen KO-Stämmen hin. Die Identifizierung dieser Suppressoren würde möglicherweise weitere Faktoren mit redundanten Funktionen aufdecken und somit das Netzwerk erweitern. Darüber hinaus könnten mit Hilfe von Suppressoren bereits aufgedeckte redundante Funktionen verifiziert werden. Falls die Überexpression bestimmter Faltungsfaktoren in einzelnen Deletionsstämmen den beobachteten Phänotyp komplementiert, bestätigt dies den redundanten Zusammenhang der beteiligten Proteine.

Die so gewonnenen Daten ermöglichen die Zusammenstellung verschiedener Faktoren, deren Überexpression gezielt die Faltung rekombinanter Proteine positiv beeinflusst. Dies ist von besonderer Bedeutung, denn obwohl es viele alternative Organismen und Expressionssysteme gibt, werden die meisten wichtigen, rekombinanten Proteine heterolog in *E. coli* exprimiert. Etliche Proteine, die im therapeutischen oder diagnostischen Bereich Anwendung finden, werden jedoch in inaktiver oder aggregierter Form produziert (Miot & Betton, 2004). Helferplasmide, die durch die gezielte Expression bestimmter Faltungsfaktoren diese Effekte verhindern, wären daher von großem Nutzen.

6 Zusammenfassung

Jede Zelle besitzt tausende verschiedene Proteine, die sich in einer Vielzahl von Eigenschaften unterscheiden. Um sicher zu stellen, dass alle Proteine aktiv sind und im richtigen zellulären Kompartiment vorliegen, hat die Evolution effiziente Kontrollmechanismen hervorgebracht. Als Modell zur Untersuchung dieser elementaren Mechanismen eignet sich das Periplasma von *E. coli*, denn es besitzt alle für die Proteinqualitätskontrolle wichtigen Faktoren (Chaperone, Proteinfaltungskatalysatoren und Proteasen). Obwohl Struktur, Funktion und Regulation der einzelnen periplasmatischen Faltungsfaktoren gut untersucht sind, ist über ihre mögliche Organisation in Faltungswege oder Netzwerke kaum etwas bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, erste Einblicke in bisher unbekannte Netzwerke der Proteinqualitätskontrolle zu erlangen und ihre Schlüsselemente zu identifizieren. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Herstellung und Charakterisierung von *E. coli*-Mutanten lieferte zahlreiche Erkenntnisse, die zum besseren Verständnis der periplasmatischen Proteinfaltung beitragen.

Durch die Herstellung synthetisch letaler Phänotypen erlangten Rizzitello *et al.* erste Erkenntnisse zur Organisation von periplasmatischen Faltungsfaktoren. Deletionsstudien ergaben letale Kombinationen für Nullmutationen in *surA* und *skp* bzw. *surA* und *degP*. Da nur diese beiden Paarungen synthetisch letale Phänotypen ergaben, die *skp degP*-Doppelmutante jedoch gänzlich unauffällig war, folgerten Rizzitello *et al.*, dass es sich bei SurA und DegP bzw. Skp um redundante Faktoren handelt, die in zwei unterschiedlichen Faltungswegen organisiert sein müssen (Rizzitello, 2001). Zur Charakterisierung möglicher Faltungswege der Proteinqualitätskontrolle wurden daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit 84 Mutanten konstruiert, die jeweils zwei ausgewählte Faltungsfaktoren nicht exprimieren. Die Identifizierung letaler Kombinationen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (optimale Bedingungen, verschiedene Stressbedingungen) und die Charakterisierung der Membranintegrität aller Doppel-KO-Stämme ergab 11 synthetische Phänotypen bzw. genetische Interaktionen, die Einfluss auf die Proteinqualitätskontrolle der Zellhülle besitzen. Anhand dieser Interaktionen konnten Rückschlüsse auf funktionelle Redundanzen der entsprechenden Genprodukte und ihre mögliche Organisation in

verschiedene Faltungswege gezogen werden. Die 11 auf diese Weise identifizierten Doppelmutanten, wurden anhand von Untersuchungen zu metabolischen Prozessen und durch qRT-PCR-Analysen genauer charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Studien konnten die Bedeutung der genetischen Interaktionen von *degP dsbA*, *degP tsp*, *surA dsbA*, *surA ptrA*, *surA yfgC*, *dsbA fkpA* und *tsp ydgD* für die Proteinqualitätskontrolle belegen. Zudem wurden SurA, DegP, Tsp und DsbA als Schlüsselemente von Proteinfaltungsprozessen identifiziert, denn an jedem Phänotyp, der auf deutliche Faltungsdefekte hinwies, war entweder eine Nullmutation in *surA*, *degP*, *tsp* oder *dsbA* beteiligt.

Mögliche funktionelle Redundanzen der verschiedenen Faltungsfaktoren ließen sich größtenteils auf Proteinebene bestätigen. So konnten durch Western Blot-Analysen gemeinsame Substrate für die Prolinisomerase SurA und die Metalloproteasen PtrA bzw. YfgC, sowie für die Serinprotease DegP und die Oxidoreduktase DsbA bzw. die Serinprotease Tsp identifiziert werden. Darüber hinaus konnten anhand dieser Methode weitere genetische Interaktionen von *degP* belegt werden, die in den vorhergehenden Untersuchungen der vorliegenden Arbeit keine Besonderheiten zeigten. So besitzen die Prolinisomerase PpiD und die Metalloprotease YfgC ebenfalls gemeinsame Substrate mit DegP. Eine mögliche redundante Funktion von DegP und Tsp konnte zusätzlich durch biochemische Analysen, wie Aktivitätstests und Studien zur Sequenzspezifität von PDZ-Domänen bestätigt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Redundanzen lassen eine strikte Trennung der untersuchten Faltungsfaktoren in starre Faltungswege nicht zu. Vielmehr belegen die Ergebnisse erstmals, dass die Proteinqualitätskontrolle als flexibles Netzwerk organisiert ist, dass sich in Abhängigkeit von Umweltbedingungen an die jeweiligen Substrat anpasst. SurA, DegP, Tsp und DsbA könnten als zentrale Elemente die einzelnen Zweige des dynamischen Faltungsnetzwerks miteinander verbinden. Diese ersten Einblicke in das bisher unbekannte Netzwerk der Proteinqualitätskontrolle und die Identifizierung der Schlüsselemente können dazu beitragen rekombinante Proteine (z. B. therapeutische Antikörper) effizienter in Bakterien zu produzieren und eröffnen mögliche Angriffspunkte für neue Antibiotika.

7 Literatur

Affholter JA, Fried VA, Roth RA. (1988) Human insulin-degrading enzyme shares structural and functional homologies with *E. coli* protease III. *Science*. 242(4884):1415-8.

Anderson JJ, Wilson JM, Oxender DL. (1979) Defective transport and other phenotypes of a periplasmic "leaky" mutant of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*. 140(2):351-8.

Antonoaea R, Fürst M, Nishiyama K, Müller M. (2008) The periplasmic chaperone PpiD interacts with secretory proteins exiting from the SecYEG translocon. *Biochemistry*. 47(20):5649-56.

Arredondo SA, Chen TF, Riggs AF, Gilbert HF, Georgiou G. (2009) Role of dimerization in the catalytic properties of the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. *J Biol Chem*. 284(36):23972-9.

Arié JP, Sassoon N, Betton JM. (2001) Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 39(1):199-210.

Baars L, Ytterberg AJ, Drew D, Wagner S, Thilo C, van Wijk KJ, de Gier JW. (2006) Defining the role of the *Escherichia coli* chaperone SecB using comparative proteomics. *J Biol Chem*. 281(15):10024-34.

Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*. 2:2006.0008.

Baneyx F, Georgiou G. (1991) Construction and characterization of *Escherichia coli* strains deficient in multiple secreted proteases: protease III degrades high-molecular-weight substrates in vivo. *J Bacteriol*. 173(8):2696-703.

Becker AB, Roth RA. (1993) Identification of glutamate-169 as the third zinc-binding residue in proteinase III, a member of the family of insulin-degrading enzymes. *Biochem J*. 292 (Pt 1):137-42.

Beebe KD, Shin J, Peng J, Chaudhury C, Khera J, Pei D. (2000) Substrate recognition through a PDZ domain in tail-specific protease. *Biochemistry*. 39(11):3149-55.

Behrens S, Maier R, de Cock H, Schmid FX, Gross CA. (2001) The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *EMBO J*. 20(1-2):285-94.

- Berkmen M, Boyd D, Beckwith J.** (2005) The nonconsecutive disulfide bond of *Escherichia coli* phytase (AppA) renders it dependent on the protein-disulfide isomerase, DsbC. *J Biol Chem.* 280(12):11387-94.
- Bessette PH, Cotto JJ, Gilbert HF, Georgiou G.** (1999) In vivo and in vitro function of the *Escherichia coli* periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *J Biol Chem.* 274(12):7784-92.
- Betton JM, Sassoon N, Hofnung M, Laurent M.** (1998) Degradation versus aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 273(15):8897-902.
- Bitto E, McKay DB.** (2002) Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins. *Structure.* 10(11):1489-98.
- Bochner BR, Gadzinski P, Panomitros E.** (2001) Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res.* 11(7):1246-55.
- Boisguérin P, Ay B, Radziwill G, Fritz RD, Moelling K, Volkmer R.** (2007) Characterization of a putative phosphorylation switch: adaptation of SPOT synthesis to analyze PDZ domain regulation mechanisms. *Chembiochem.* 8(18):2302-7.
- Bos MP, Robert V, Tommassen J.** (2007) Functioning of outer membrane protein assembly factor Omp85 requires a single POTRA domain. *EMBO Rep.* 8(12):1149-54
- Bulieris PV, Behrens S, Holst O, Kleinschmidt JH.** (2003) Folding and insertion of the outer membrane protein OmpA is assisted by the chaperone Skp and by lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 278(11):9092-9.
- Clubb RT, Ferguson SB, Walsh CT, Wagner G.** (1994) Three-dimensional solution structure of *Escherichia coli* periplasmic cyclophilin. *Biochemistry.* 33(10):2761-72.
- Cornista J, Ikeuchi S, Haruki M, Kohara A, Takano K, Morikawa M, Kanaya S.** (2004) Cleavage of various peptides with pitrilysin from *Escherichia coli*: kinetic analyses using beta-endorphin and its derivatives. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68(10):2128-37.
- Danese PN, Silhavy TJ.** (1997) The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 11(9):1183-93.
- Danese PN, Silhavy TJ.** (1998) CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J Bacteriol.* 180(4):831-9.
- Darby NJ, Raina S, Creighton TE.** (1998) Contributions of substrate binding to the catalytic activity of DsbC. *Biochemistry.* 37(3):783-91.

Dartigalongue C, Raina S. (1998) A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 17(14):3968-80.

Dartigalongue C, Missiakas D, Raina S. (2001) Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem.* 276(24):20866-75.

de Keyzer J, van der Does C, Driessen AJ. (2003) The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell Mol Life Sci.* 60(10):2034-52.

Deutsche Industrievereinigung Biotechnologie (DIB) im Verband der Chemischen Industrie e.V. (VCI) (Hg.): Faltblatt: „Auf einen Blick – Biotechnologie 2009“ [Stand: August 2009]

Driessen AJ, Nouwen N. (2008) Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem.* 77:643-67.

EARSS Annual Report 2007:

URL: http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202007_FINAL_tcm61-55933.pdf

Economou A, Wickner W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell.* 78(5):835-43.

ECCE Database, URL: www.cf.ac.uk/biosi/staffinfo/ehrmann/tools/ecce/ecce.htm

Ehrmann M. (2005) Protein folding in the periplasm and outer membrane of *E. coli*. in: *Protein Folding Handbook. Part II.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Fink AL. (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev.* 79(2):425-49.

Flower AM, Osborne RS, Silhavy TJ. (1995) The allele-specific synthetic lethality of *prlA-prlG* double mutants predicts interactive domains of SecY and SecE. *EMBO J.* 14(5):884-93.

Franchini AG, Egli T. (2006) Global gene expression in *Escherichia coli* K-12 during short-term and long-term adaptation to glucose-limited continuous culture conditions. *Microbiology.* 152(Pt 7):2111-27.

Göthel SF, Marahiel MA. (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci.* 55(3):423-36.

Grau S, Baldi A, Bussani R, Tian X, Stefanescu R, Przybylski M, Richards P, Jones SA, Shridhar V, Clausen T, Ehrmann M. (2005) Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(17):6021-6.

Grauschopf U, Winther JR, Korber P, Zander T, Dallinger P, Bardwell JC. (1995) Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell.* 83(6):947-55.

- Grigorova IL, Chaba R, Zhong HJ, Alba BM, Rhodius V, Herman C, Gross CA.** (2004) Fine-tuning of the *Escherichia coli* sigmaE envelope stress response relies on multiple mechanisms to inhibit signal-independent proteolysis of the transmembrane anti-sigma factor, RseA. *Genes Dev.* 18(21):2686-97.
- Grimshaw JP, Stirnimann CU, Brozzo MS, Malojcic G, Grütter MG, Capitani G, Glockshuber R.** (2008) DsbL and DsbI form a specific dithiol oxidase system for periplasmic arylsulfate sulfotransferase in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 380(4):667-80.
- Guddat LW, Bardwell JC, Martin JL.** (1998) Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stabilization. *Structure.* 6(6):757-67.
- Hagiwara D, Sugiura M, Oshima T, Mori H, Aiba H, Yamashino T, Mizuno T.** (2003) Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 185(19):5735-46.
- Hara H, Nishimura Y, Kato J, Suzuki H, Nagasawa H, Suzuki A, Hirota Y.** (1989) Genetic analyses of processing involving C-terminal cleavage in penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 171(11):5882-9.
- Hara H, Yamamoto Y, Higashitani A, Suzuki H, Nishimura Y.** (1991) Cloning, mapping, and characterization of the *Escherichia coli* *prc* gene, which is involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3. *J Bacteriol.* 173(15):4799-813.
- Harrison R, Papp B, Pál C, Oliver SG, Delneri D.** (2007) Plasticity of genetic interactions in metabolic networks of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(7):2307-12.
- Harms N, Koningstein G, Dontje W, Muller M, Oudega B, Luirink J, de Cock H.** (2001) The early interaction of the outer membrane protein phoE with the periplasmic chaperone Skp occurs at the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem.* 276(22):18804-11.
- Hasenbein S, Merdanovic M, Ehrmann M.** (2007) Determinants of regulated proteolysis in signal transduction. *Genes Dev.* 21(1):6-10.
- Hasenbein S, Meltzer M, Hauske P, Kaiser M, Huber R, Clausen T, Ehrmann M.** (2010) Conversion of a regulatory into a degradative protease. *J Mol Biol.* 397(4):957-66.
- Hasman H, Chakraborty T, Klemm P.** (1999) Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J Bacteriol.* 181(16):4834-41.
- Hauske P, Meltzer M, Ottmann C, Krojer T, Clausen T, Ehrmann M, Kaiser M.** (2009) Selectivity profiling of DegP substrates and inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 17(7):2920-4.
- Hebert DN, Molinari M.** (2007) In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev.* 87(4):1377-408.

- Hiniker A, Bardwell JC.** (2004) In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem.* 279(13):12967-73.
- Hong H, Patel DR, Tamm LK, van den Berg B.** (2006) The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel. *J Biol Chem.* 281(11):7568-77.
- Horne SM, Young KD.** (1995) *Escherichia coli* and other species of the Enterobacteriaceae encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins. *Arch Microbiol.* 163(5):357-65.
- Hullmann J, Patzer SI, Römer C, Hantke K, Braun V.** (2008) Periplasmic chaperone FkpA is essential for imported colicin M toxicity. *Mol Microbiol.* 69(4):926-37.
- Inaba K.** (2009) Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*. *J Biochem.* 146(5):591-7.
- Isaac DD, Pinkner JS, Hultgren SJ, Silhavy TJ.** (2005) The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(49):17775-9.
- Iwanczyk J, Damjanovic D, Kooistra J, Leong V, Jomaa A, Ghirlando R, Ortega J.** (2007) Role of the PDZ domains in *Escherichia coli* DegP protein. *J Bacteriol.* 189(8):3176-86.
- Jeleń F, Oleksy A, Smietana K, Otlewski J.** (2003) PDZ domains - common players in the cell signaling. *Acta Biochim Pol.* 50(4):985-1017.
- Jemth P, Gianni S.** (2007) PDZ domains: folding and binding. *Biochemistry.* 46(30):8701-8.
- Jones CH, Danese PN, Pinkner JS, Silhavy TJ, Hultgren SJ.** (1997) The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J.* 6(21):6394-406.
- Jubelin G, Vianney A, Beloin C, Ghigo JM, Lazzaroni JC, Lejeune P, Dorel C.** (2005) CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 187(6):2038-49.
- Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H, Krogh A.** (2003) Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* 12(8):1652-62.
- Justice SS, Hunstad DA, Harper JR, Duguay AR, Pinkner JS, Bann J, Frieden C, Silhavy TJ, Hultgren SJ.** (2005) Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 187(22):7680-6.
- Katzen F, Beckwith J.** (2000) Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell.* 103(5):769-79.

- Keiler KC, Sauer RT.** (1995) Identification of active site residues of the Tsp protease. *J Biol Chem.* 270(48):28864-8.
- Keiler KC, Sauer RT.** (1996a) Sequence determinants of C-terminal substrate recognition by the Tsp protease. *J Biol Chem.* 271(5):2589-93.
- Keiler KC, Waller PR, Sauer RT.** (1996b) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science.* 271(5251):990-3.
- Kihara A, Ito K.** (1998) Translocation, folding, and stability of the HflKC complex with signal anchor topogenic sequences. *J Biol Chem.* 273(45):29770-5.
- Kleerebezem M, Heutink M, Tommassen J.** (1995) Characterization of an *Escherichia coli* *rotA* mutant, affected in periplasmic peptidyl-prolyl cis/trans isomerase. *Mol Microbiol.* 18(2):313-20.
- Koch HG, Moser M, Müller M.** (2003) Signal recognition particle-dependent protein targeting, universal to all kingdoms of life. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 146:55-94.
- Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P.** (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol.* 37(2):239-53.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH.** (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science.* 269(5231):1737-40.
- Krojer T, Garrido-Franco M, Huber R, Ehrmann M, Clausen T.** (2002) Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature.* 416(6879):455-9.
- Krojer T, Sawa J, Schäfer E, Saibil HR, Ehrmann M, Clausen T.** (2008) Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature.* 453(7197):885-90.
- Kurochkin IV.** (2001) Insulin-degrading enzyme: embarking on amyloid destruction. *Trends Biochem Sci.* 26(7):421-5.
- Laemmli UK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5.
- Lazar SW, Kolter R.** (1996) SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J Bacteriol.* 178(6):1770-3.
- Lee C, Li P, Inouye H, Brickman ER, Beckwith J.** (1989) Genetic studies on the inability of beta-galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *J Bacteriol.* 171(9):4609-16.

- Lee PA, Tullman-Ercek D, Georgiou G.** (2006) The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol.* 60:373-95.
- Liu X, Wang CC.** (2001) Disulfide-dependent folding and export of *Escherichia coli* DsbC. *J Biol Chem.* 276(2):1146-51.
- Mamant N** (2009) Charakterisierung des Aktivierungsmechanismus der HtrA-Protease DegP von *E. coli*. *Dissertation Universität Duisburg-Essen.*
- Maniatis, T. Fritsch, E.F. and Sambrook, J** (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2nd edn, *Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY*
- Martin JL, Bardwell JC, Kuriyan J.** (1993) Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation *in vivo*. *Nature.* 365(6445):464-8.
- Maskos K, Bode W.** (2003) Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biotechnol.* 25(3):241-66.
- McNulty BC, Young GB, Pielak GJ.** (2006) Macromolecular crowding in the *Escherichia coli* periplasm maintains alpha-synuclein disorder. *J Mol Biol.* 355(5):893-7.
- Meccas J, Rouviere PE, Erickson JW, Donohue TJ, Gross CA.** (1993) The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* 7(12B):2618-28.
- Meltzer M** (2008) Struktur- und Funktionsanalyse der hochkonservierten Stressprotease DegP von *E. coli*. *Dissertation Universität Duisburg-Essen.*
- Messens J, Collet JF, Van Belle K, Brosens E, Loris R, Wyns L.** (2007) The oxidase DsbA folds a protein with a nonconsecutive disulfide. *J Biol Chem.* 282(43):31302-7.
- Miller JM.** (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY*
- Miot M, Betton JM.** (2004) Protein quality control in the bacterial periplasm. *Microb Cell Fact.* 3(1):4.
- Misra R, Peterson A, Ferenci T, Silhavy TJ.** (1991) A genetic approach for analyzing the pathway of LamB assembly into the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 266(21):13592-7.
- Mössner E, Huber-Wunderlich M, Glockshuber R.** (1998) Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci.* 7(5):1233-44.

- Mogensen JE, Otzen DE.** (2005) Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol.* 57(2): 326-46
- Nagasawa H, Sakagami Y, Suzuki A, Suzuki H, Hara H, Hirota Y.** (1989) Determination of the cleavage site involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 171(11):5890-3.
- Nakatogawa H, Ito K.** (2001) Secretion monitor, SecM, undergoes self-translation arrest in the cytosol. *Mol Cell.* 7(1):185-92
- Neu HC, Heppel LA.** (1964) The release of ribonuclease into the medium when *Escherichia coli* cells are converted to spheroplasts. *J Biol Chem.* 239:3893-900.
- Önder O, Turkarslan S, Sun D, Daldal F.** (2008) Overproduction or absence of the periplasmic protease DegP severely compromises bacterial growth in the absence of the dithiol: disulfide oxidoreductase DsbA. *Mol Cell Proteomics.* 7(5):875-90.
- Otto K, Silhavy TJ.** (2002) Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(4):2287-92.
- Papanikou E, Karamanou S, Economou A.** (2007) Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol.* 5(11):839-51.
- Pfaffl MW.** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45.
- Pogliano J, Lynch AS, Belin D, Lin EC, Beckwith J.** (1997) Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev.* 11(9):1169-82.
- Price NL, Raivio TL.** (2009) Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia coli* strain MC4100. *J Bacteriol.* 191(6):1798-815.
- Plun-Favreau H, Klupsch K, Moiso N, Gandhi S, Kjaer S, Frith D, Harvey K, Deas E, Harvey RJ, McDonald N, Wood NW, Martins LM, Downward J.** (2007) The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol.* 9(11):1243-52.
- Pugsley AP.** (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* 57(1):50-108
- Qu J, Mayer C, Behrens S, Holst O, Kleinschmidt JH.** (2007) The trimeric periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* forms 1:1 complexes with outer membrane proteins via hydrophobic and electrostatic interactions. *J Mol Biol.* 374(1):91-105.

- Raffa RG, Raivio TL.** (2002) A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 45(6):1599-611.
- Rahfeld JU, Schierhorn A, Mann K, Fischer G.** (1994) A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 343(1):65-9.
- Raivio TL, Silhavy TJ.** (2001) Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol.* 55:591-624.
- Raivio TL.** (2005) Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol.* 56(5):1119-28.
- Rawlings ND, Barrett AJ.** (1995) Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 248:183-228.
- Rhodium VA, Suh WC, Nonaka G, West J, Gross CA.** (2006) Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol.* 4(1):e2.
- Rizzitello AE, Harper JR, Silhavy TJ.** (2001) Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 183(23):6794-800.
- Robert V, Volokhina EB, Senf F, Bos MP, Van Gelder P, Tommassen J.** (2006) Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol.* 4(11):e377.
- Rouvière PE, De Las Peñas A, Mecsas J, Lu CZ, Rudd KE, Gross CA.** (1995) *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, sigma E, in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14(5):1032-42.
- Rouvière PE, Gross CA.** (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev.* 10(24):3170-82.
- Ruiz N, Silhavy TJ.** (2005) Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr Opin Microbiol.* 8(2):122-6.
- Saul FA, Arié JP, Vulliez-le Normand B, Kahn R, Betton JM, Bentley GA.** (2004) Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a cis/trans peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *J Mol Biol.* 335(2):595-608.
- Sawa J, Heuck A, Ehrmann M, Clausen T.** (2010) Molecular transformers in the cell: lessons learned from the DegP protease-chaperone. *Curr Opin Struct Biol.* 20(2):253-8.
- Schäfer U, Beck K, Müller M.** (1999) Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J Biol Chem.* 274(35):24567-74.

- Schmid FX, Baldwin RL.** (1978) Acid catalysis of the formation of the slow-folding species of RNase A: evidence that the reaction is proline isomerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(10):4764-8.
- Sklar JG, Wu T, Kahne D, Silhavy TJ.** (2007a) Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 21(19):2473-84.
- Sklar JG, Wu T, Gronenberg LS, Malinverni JC, Kahne D, Silhavy TJ.** (2007b) Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(15):6400-5.
- Spiers A, Lamb HK, Cocklin S, Wheeler KA, Budworth J, Dodds AL, Pallen MJ, Maskell DJ, Charles IG, Hawkins AR.** (2002) PDZ domains facilitate binding of high temperature requirement protease A (HtrA) and tail-specific protease (Tsp) to heterologous substrates through recognition of the small stable RNA A (ssrA)-encoded peptide. *J Biol Chem.* 277(42):39443-9.
- Spiess C, Beil A, Ehrmann M.** (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell.* 97(3):339-47.
- Strauch KL, Beckwith J.** (1988) An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(5):1576-80.
- Stein RL.** (1993) Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis-trans isomerization. *Adv Protein Chem.* 44:1-24.
- Stymest KH, Klappa P.** (2008) The periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases PpiD and SurA have partially overlapping substrate specificities. *FEBS J.* 275(13):3470-9.
- Tadokoro A, Hayashi H, Kishimoto T, Makino Y, Fujisaki S, Nishimura Y.** (2004) Interaction of the *Escherichia coli* lipoprotein Nlpl with periplasmic Prc (Tsp) protease. *J Biochem.* 135(2):185-91.
- Tamae C, Liu A, Kim K, Sitz D, Hong J, Becket E, Bui A, Solaimani P, Tran KP, Yang H, Miller JH.** (2008) Determination of antibiotic hypersensitivity among 4,000 single-gene-knockout mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 190(17):5981-8.
- Tohsato Y, Mori H.** (2008) Phenotype profiling of single gene deletion mutants of *E. coli* using Biolog technology. *Genome Inform.* 21:42-52.
- Tormo A, Almirón M, Kolter R.** (1990) *surA*, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. *J Bacteriol.* 172(8):4339-47.
- Umakoshi H, Kuboi R, Komasa I, Tsuchido T, Matsumura Y.** (1998) Heat-induced translocation of cytoplasmic beta-galactosidase across inner membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 14(2):210-7.

- Ureta AR, Endres RG, Wingreen NS, Silhavy TJ.** (2007) Kinetic analysis of the assembly of the outer membrane protein LamB in *Escherichia coli* mutants each lacking a secretion or targeting factor in a different cellular compartment. *J Bacteriol.* 189(2):446-54.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7):RESEARCH0034.
- van Ham M, Hendriks W.** (2003) PDZ domains-glue and guide. *Mol Biol Rep.* 30(2):69-82.
- Vertommen D, Ruiz N, Leverrier P, Silhavy TJ, Collet JF.** (2009) Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics. *Proteomics.* 9(9):2432-43.
- Walton TA, Sousa MC.** (2004) Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol Cell.* 15(3):367-74.
- Walton TA, Sandoval CM, Fowler CA, Pardi A, Sousa MC.** (2009) The cavity-chaperone Skp protects its substrate from aggregation but allows independent folding of substrate domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(6):1772-7.
- Wilken C, Kitzing K, Kurzbauer R, Ehrmann M, Clausen T.** (2004) Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell.* 117(4):483-94.
- Wunderlich M, Glockshuber R.** (1993) In vivo control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). *J Biol Chem.* 268(33):24547-50.
- Zapun A, Missiakas D, Raina S, Creighton TE.** (1995) Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 34(15):5075-89.
- Zhai Y, Saier MH Jr.** (2002) The beta-barrel finder (BBF) program, allowing identification of outer membrane beta-barrel proteins encoded within prokaryotic genomes. *Protein Sci.* 11(9):2196-207.
- Zhou L, Lei XH, Bochner BR, Wanner BL.** (2003) Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J Bacteriol.* 185(16):4956-72.

8 Anhang

PM1 MicroPlate™ Carbon Sources

A1 Negative Control	A2 L-Arabinose	A3 N-Acetyl-D- Glucosamine	A4 D-Saccharic Acid	A5 Succinic Acid	A6 D-Galactose	A7 L-Aspartic Acid	A8 L-Proline	A9 D-Alanine	A10 D-Trehalose	A11 D-Mannose	A12 Dulcitol
B1 D-Serine	B2 D-Sorbitol	B3 Glycerol	B4 L-Fucose	B5 D-Glucuronic Acid	B6 D-Gluconic Acid	B7 D,L- α -Glycerol- Phosphate	B8 D-Xylose	B9 L-Lactic Acid	B10 Formic Acid	B11 D-Mannitol	B12 L-Glutamic Acid
C1 D-Glucose-6- Phosphate	C2 D-Galactonic Acid- γ -Lactone	C3 D,L-Malic Acid	C4 D-Ribose	C5 Tween 20	C6 L-Rhamnose	C7 D-Fructose	C8 Acetic Acid	C9 α -D-Glucose	C10 Maltose	C11 D-Melibiose	C12 Thymidine
D-1 L-Asparagine	D2 D-Aspartic Acid	D3 D-Glucosaminic Acid	D4 1,2-Propanediol	D5 Tween 40	D6 α -Keto-Glutaric Acid	D7 α -Keto-Butyric Acid	D8 α -Methyl-D- Galactoside	D9 α -D-Lactose	D10 Lactulose	D11 Sucrose	D12 Uridine
E1 L-Glutamine	E2 M-Tartaric Acid	E3 D-Glucose-1- Phosphate	E4 D-Fructose-6- Phosphate	E5 Tween 80	E6 α -Hydroxy Glutaric Acid- γ - Lactone	E7 α -Hydroxy Butyric Acid	E8 β -Methyl-D- Glucoside	E9 Adonitol	E10 Maltotriose	E11 2-Deoxy- Adenosine	E12 Adenosine
F1 Glycyl-L- Aspartic Acid	F2 Citric Acid	F3 M-Inositol	F4 D-Threonine	F5 Fumaric Acid	F6 Bromo Succinic Acid	F7 Propionic Acid	F8 Mucic Acid	F9 Glycolic Acid	F10 Glyoxylic Acid	F11 D-Cellobiose	F12 Inosine
G1 Glycyl-L- Glutamic Acid	G2 Tricarballic Acid	G3 L-Serine	G4 L-Threonine	G5 L-Alanine	G6 L-Alanyl- Glycine	G7 Acetoacetic Acid	G8 N-Acetyl- β -D- Mannosamine	G9 Mono Methyl Succinate	G10 Methyl Pyruvate	G11 D-Malic Acid	G12 L-Malic Acid
H1 Glycyl-L- Proline	H2 p -Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H3 m -Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H4 Tyramine	H5 D-Psicose	H6 L-Lyxose	H7 Glucuronamide	H8 Pyruvic Acid	H9 L-Galactonic Acid- γ -Lactone	H10 D-Galacturonic Acid	H11 Phenylethyl- amine	H12 2-Aminoethanol

PM2A MicroPlate™ Carbon Sources

A1 Negative Control	A2 Chondroitin Sulfate C	A3 α -Cyclodextrin	A4 β -Cyclodextrin	A5 γ -Cyclodextrin	A6 Dextrin	A7 Gelatin	A8 Glycogen	A9 Inulin	A10 Laminarin	A11 Mannan	A12 Pectin
B1 N-Acetyl-D- Galactosamine	B2 N-Acetyl- Neuraminic Acid	B3 β -D-Allose	B4 Amygdalin	B5 D-Arabinose	B6 D-Arabitol	B7 L-Arabitol	B8 Arbutin	B9 2-Deoxy-D- Ribose	B10 L-Erythritol	B11 D-Fucose	B12 3-O- β -D- Galacto- pyranosyl-D- Arabinose
C1 Gentiobiose	C2 L-Glucose	C3 Lactitol	C4 D-Melezitose	C5 Maltitol	C6 α -Methyl-D- Glucoside	C7 β -Methyl-D- Galactoside	C8 3-Methyl Glucose	C9 β -Methyl-D- Glucuronic Acid	C10 α -Methyl-D- Mannoside	C11 β -Methyl-D- Xyloside	C12 Palatinose
D1 D-Raffinose	D2 Salicin	D3 Sedoheptulosa- n	D4 D-Sorbose	D5 Stachyose	D6 D-Tagatose	D7 Turannose	D8 Xylitol	D9 N-Acetyl-D- Glucosaminitol	D10 γ -Amino Butyric Acid	D11 δ -Amino Valeric Acid	D12 Butyric Acid
E1 Capric Acid	E2 Caproic Acid	E3 Citraconic Acid	E4 Citramalic Acid	E5 D-Glucosamine	E6 2-Hydroxy Benzoic Acid	E7 4-Hydroxy Benzoic Acid	E8 β -Hydroxy Butyric Acid	E9 γ -Hydroxy Butyric Acid	E10 α -Keto Valeric Acid	E11 Itaconic Acid	E12 5-Keto-D- Gluconic Acid
F1 D-Lactic Acid Methyl Ester	F2 Malonic Acid	F3 Melibionnic Acid	F4 Oxalic Acid	F5 Oxalomalic Acid	F6 Quinic Acid	F7 D-Ribono-1,4- Lactone	F8 Sebacic Acid	F9 Sorbic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 D-Tartaric Acid	F12 L-Tartaric Acid
G1 Acetamide	G2 L-Alaninamide	G3 N-Acetyl-L- Glutamic Acid	G4 L-Arginine	G5 Glycine	G6 L-Histidine	G7 L-Homoserine	G8 Hydroxy-L- Proline	G9 L-Isoleucine	G10 L-Leucine	G11 L-Lysine	G12 L-Methionine
H1 L-Ornithine	H2 L- Phenylalanine	H3 L-Pyrogutamic Acid	H4 L-Valine	H5 D,L-Carnitine	H6 Sec-Butylamine	H7 D,L- Octopamine	H8 Putrescine	H9 Dihydroxy Acetone	H10 2,3-Butanediol	H11 2,3-Butanone	H12 3-Hydroxy 2- Butanone

Abb. 8. 1: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 1 und 2

PM3B MicroPlate™ Nitrogen Sources

A1 Negative Control	A2 Ammonia	A3 Nitrite	A4 Nitrate	A5 Urea	A6 Biuret	A7 L-Alanine	A8 L-Arginine	A9 L-Asparagine	A10 L-Aspartic Acid	A11 L-Cysteine	A12 L-Glutamic Acid
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 L-Proline	B10 L-Serine	B11 L-Threonine	B12 L-Tryptophan
C1 L-Tyrosine	C2 L-Valine	C3 D-Alanine	C4 D-Asparagine	C5 D-Aspartic Acid	C6 D-Glutamic Acid	C7 D-Lysine	C8 D-Serine	C9 D-Valine	C10 L-Citrulline	C11 L-Homoserine	C12 L-Ornithine
D-1 N-Acetyl-D,L- Glutamic Acid	D2 N-Phthaloyl-L- Glutamic Acid	D3 L-Pyroglutamic Acid	D4 Hydroxylamine	D5 Methylamine	D6 N-Amylamine	D7 N-Butylamine	D8 Ethylamine	D9 Ethanolamine	D10 Ethylenediamin e	D11 Putrescine	D12 Agmatine
E1 Histamine	E2 β-Phenylethyl- amine	E3 Tyramine	E4 Acetamide	E5 Formamide	E6 Glucuronamide	E7 D,L-Lactamide	E8 D-Glucosamine	E9 D- Galactosamine	E10 D- Mannosamine	E11 N-Acetyl-D- Glucosamine	E12 N-Acetyl-D- Galactosamine
F1 N-Acetyl-D- Mannosamine	F2 Adenine	F3 Adenosine	F4 Cytidine	F5 Cytosine	F6 Guanine	F7 Guanosine	F8 Thymine	F9 Thymidine	F10 Uracil	F11 Uridine	F12 Inosine
G1 Xanthine	G2 Xanthosine	G3 Uric Acid	G4 Alloxan	G5 Allantoin	G6 Parabanic Acid	G7 D,L-α-Amino-N- Butyric Acid	G8 γ-Amino-N- Butyric Acid	G9 ε-Amino-N- Caproic Acid	G10 D,L-α-Amino- Caprylic Acid	G11 δ-Amino-N- Valeric Acid	G12 α-Amino-N- Valeric Acid
H1 Ala-Asp	H2 Ala-Gln	H3 Ala-Glu	H4 Ala-Gly	H5 Ala-His	H6 Ala-Leu	H7 Ala-Thr	H8 Gly-Asn	H9 Gly-Gln	H10 Gly-Glu	H11 Gly-Met	H12 Met-Ala

PM4A MicroPlate™ Phosphorus and Sulfur Sources

A1 Negative Control	A2 Phosphate	A3 Pyrophosphate	A4 Trimeta- phosphate	A5 Tripoly- phosphate	A6 Triethyl Phosphate	A7 Hypophosphite	A8 Adenosine- 2'- monophosphate	A9 Adenosine- 3'- monophosphate	A10 Adenosine- 5'- monophosphate	A11 Adenosine- 2',3'-cyclic monophosphate	A12 Adenosine- 3',5'-cyclic monophosphate
B1 Thiophosphate	B2 Dithiophosphat e	B3 D,L-α-Glycerol Phosphate	B4 β-Glycerol Phosphate	B5 Carbamyl Phosphate	B6 D-2-Phospho- Glyceric Acid	B7 D-3-Phospho- Glyceric Acid	B8 Guanosine- 2'- monophosphate	B9 Guanosine- 3'- monophosphate	B10 Guanosine- 5'- monophosphate	B11 Guanosine- 2',3'-cyclic monophosphate	B12 Guanosine- 3',5'-cyclic monophosphate
C1 Phosphoenol Pyruvate	C2 Phospho- Glycolic Acid	C3 D-Glucose-1- Phosphate	C4 D-Glucose-6- Phosphate	C5 2-Deoxy-D- Glucose 6- Phosphate	C6 D- Glucosamine-6- Phosphate	C7 6-Phospho- Gluconic Acid	C8 Cytidine- 2'- monophosphate	C9 Cytidine- 3'- monophosphate	C10 Cytidine- 5'- monophosphate	C11 Cytidine- 2',3'- cyclic monophosphate	C12 Cytidine- 3',5'- cyclic monophosphate
D1 D-Mannose-1- Phosphate	D2 D-Mannose-6- Phosphate	D3 Cysteamine-S- Phosphate	D4 Phospho-L- Arginine	D5 O-Phospho-D- Serine	D6 O-Phospho-L- Serine	D7 O-Phospho-L- Threonine	D8 Uridine- 2'- monophosphate	D9 Uridine- 3'- monophosphate	D10 Uridine- 5'- monophosphate	D11 Uridine- 2',3'- cyclic monophosphate	D12 Uridine- 3',5'- cyclic monophosphate
E1 O-Phospho-D- Tyrosine	E2 O-Phospho-L- Tyrosine	E3 Phosphocreatin e	E4 Phosphoryl Choline	E5 O-Phosphoryl- Ethanolamine	E6 Phosphono Acetic Acid	E7 2-Aminoethyl Phosphonic Acid	E8 Methylene Diphosphonic Acid	E9 Thymidine- 3'- monophosphate	E10 Thymidine- 5'- monophosphate	E11 Inositol Hexaphosphate	E12 Thymidine 3',5'-cyclic monophosphate
F1 Negative Control	F2 Sulfate	F3 Thiosulfate	F4 Tetrathionate	F5 Thiophosphate	F6 Dithiophosphat e	F7 L-Cysteine	F8 D-Cysteine	F9 L-Cysteiny- Glycine	F10 L-Cysteic Acid	F11 Cysteamine	F12 L-Cysteine Sulfinic Acid
G1 N-Acetyl-L- Cysteine	G2 S-Methyl-L- Cysteine	G3 Cystathionine	G4 Lanthionine	G5 Glutathione	G6 D,L-Ethionine	G7 L-Methionine	G8 D-Methionine	G9 Glycyl-L- Methionine	G10 N-Acetyl-D,L- Methionine	G11 L-Methionine Sulfoxide	G12 L-Methionine Sulfone
H1 L-Djenkolic Acid	H2 Thiourea	H3 1-Thio-β-D- Glucose	H4 D,L-Lipoamide	H5 Taurocholic Acid	H6 Taurine	H7 Hypotaaurine	H8 p-Amino Benzene Sulfonic Acid	H9 Butane Sulfonic Acid	H10 2- Hydroxyethane Sulfonic Acid	H11 Methane Sulfonic Acid	H12 Tetramethylene Sulfone

Abb. 8. 2: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 3 und 4

PM5 MicroPlate™ Nutrient Supplements

A1 Negative Control	A2 Positive Control	A3 L-Alanine	A4 L-Arginine	A5 L-Asparagine	A6 L-Aspartic Acid	A7 L-Cysteine	A8 L-Glutamic Acid	A9 Adenosine- 3',5'-cyclic monophosphate	A10 Adenine	A11 Adenosine	A12 2'-Deoxy Adenosine
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L- Phenylalanine	B9 Guanosine- 3',5'-cyclic monophosphate	B10 Guanine	B11 Guanosine	B12 2'-Deoxy Guanosine
C1 L-Proline	C2 L-Serine	C3 L-Threonine	C4 L-Tryptophan	C5 L-Tyrosine	C6 L-Valine	C7 L-Isoleucine + L-Valine	C8 trans-4-Hydroxy L-Proline	C9 (5) 4-Amino- imidazole-4(5)- Carboxamide	C10 Hypoxanthine	C11 Inosine	C12 2'-Deoxy Inosine
D1 L-Ornithine	D2 L-Citrulline	D3 Chorismic Acid	D4 (-)-Shikimic Acid	D5 L-Homoserine Lactone	D6 D-Alanine	D7 D-Aspartic Acid	D8 D-Glutamic Acid	D9 D,L-α,- Diamino-pimelic Acid	D10 Cytosine	D11 Cytidine	D12 2'-Deoxy Cytidine
E1 Putrescine	E2 Spermidine	E3 Spermine	E4 Pyridoxine	E5 Pyridoxal	E6 Pyridoxamine	E7 β-Alanine	E8 D-Pantothenic Acid	E9 Orotic Acid	E10 Uracil	E11 Uridine	E12 2'-Deoxy Uridine
F1 Quinolinic Acid	F2 Nicotinic Acid	F3 Nicotinamide	F4 β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide	F5 β-Amino- Levulinic Acid	F6 Hematin	F7 Deferoxamine Mesylate	F8 D-(+)-Glucose	F9 N-Acetyl D-Glucosamine	F10 Thymine	F11 Glutathione (reduced form)	F12 Thymidine
G1 Oxaloacetic Acid	G2 D-Biotin	G3 Cyano- Cobalamin	G4 p-Amino- Benzoic Acid	G5 Folic Acid	G6 Inosine + Thiamine	G7 Thiamine	G8 Thiamine Pyrophosphate	G9 Riboflavin	G10 Pyrrolo- Quinoline Quinone	G11 Menadione	G12 Myo-Inositol
H1 Butyric Acid	H2 D,L-α-Hydroxy- Butyric Acid	H3 α-Ketobutyric Acid	H4 Caprylic Acid	H5 D,L-α-Lipolic Acid (oxidized form)	H6 D,L-Mevalonic Acid	H7 D,L-Carnitine	H8 Choline	H9 Tween 20	H10 Tween 40	H11 Tween 60	H12 Tween 80

PM6 MicroPlate™ Peptide Nitrogen Sources

A1 Negative Control	A2 Positive Control: L- Glutamine	A3 Ala-Ala	A4 Ala-Arg	A5 Ala-Asn	A6 Ala-Glu	A7 Ala-Gly	A8 Ala-His	A9 Ala-Leu	A10 Ala-Lys	A11 Ala-Phe	A12 Ala-Pro
B1 Ala-Ser	B2 Ala-Thr	B3 Ala-Trp	B4 Ala-Tyr	B5 Arg-Ala	B6 Arg-Arg	B7 Arg-Asp	B8 Arg-Gln	B9 Arg-Glu	B10 Arg-Ile	B11 Arg-Leu	B12 Arg-Lys
C1 Arg-Met	C2 Arg-Phe	C3 Arg-Ser	C4 Arg-Trp	C5 Arg-Tyr	C6 Arg-Val	C7 Asn-Glu	C8 Asn-Val	C9 Asp-Asp	C10 Asp-Glu	C11 Asp-Leu	C12 Asp-Lys
D1 Asp-Phe	D2 Asp-Trp	D3 Asp-Val	D4 Cys-Gly	D5 Gln-Gln	D6 Gln-Gly	D7 Glu-Asp	D8 Glu-Glu	D9 Glu-Gly	D10 Glu-Ser	D11 Glu-Trp	D12 Glu-Tyr
E1 Glu-Val	E2 Gly-Ala	E3 Gly-Arg	E4 Gly-Cys	E5 Gly-Gly	E6 Gly-His	E7 Gly-Leu	E8 Gly-Lys	E9 Gly-Met	E10 Gly-Phe	E11 Gly-Pro	E12 Gly-Ser
F1 Gly-Thr	F2 Gly-Trp	F3 Gly-Tyr	F4 Gly-Val	F5 His-Asp	F6 His-Gly	F7 His-Leu	F8 His-Lys	F9 His-Met	F10 His-Pro	F11 His-Ser	F12 His-Trp
G1 His-Tyr	G2 His-Val	G3 Ile-Ala	G4 Ile-Arg	G5 Ile-Gln	G6 Ile-Gly	G7 Ile-His	G8 Ile-Ile	G9 Ile-Met	G10 Ile-Phe	G11 Ile-Pro	G12 Ile-Ser
H1 Ile-Trp	H2 Ile-Tyr	H3 Ile-Val	H4 Leu-Ala	H5 Leu-Arg	H6 Leu-Asp	H7 Leu-Glu	H8 Leu-Gly	H9 Leu-Ile	H10 Leu-Leu	H11 Leu-Met	H12 Leu-Phe

Abb. 8.3: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 5 und 6

PM7 MicroPlate™ Peptide Nitrogen Sources

A1 Negative Control	A2 Positive Control: L- Glutamine	A3 Leu-Ser	A4 Leu-Trp	A5 Leu-Val	A6 Lys-Ala	A7 Lys-Arg	A8 Lys-Glu	A9 Lys-Ile	A10 Lys-Leu	A11 Lys-Lys	A12 Lys-Phe
B1 Lys-Pro	B2 Lys-Ser	B3 Lys-Thr	B4 Lys-Trp	B5 Lys-Tyr	B6 Lys-Val	B7 Met-Arg	B8 Met-Asp	B9 Met-Gln	B10 Met-Glu	B11 Met-Gly	B12 Met-His
C1 Met-Ile	C2 Met-Leu	C3 Met-Lys	C4 Met-Met	C5 Met-Phe	C6 Met-Pro	C7 Met-Trp	C8 Met-Val	C9 Phe-Ala	C10 Phe-Gly	C11 Phe-Ile	C12 Phe-Phe
D1 Phe-Pro	D2 Phe-Ser	D3 Phe-Trp	D4 Pro-Ala	D5 Pro-Asp	D6 Pro-Gln	D7 Pro-Gly	D8 Pro-Hyp	D9 Pro-Leu	D10 Pro-Phe	D11 Pro-Pro	D12 Pro-Tyr
E1 Ser-Ala	E2 Ser-Gly	E3 Ser-His	E4 Ser-Leu	E5 Ser-Met	E6 Ser-Phe	E7 Ser-Pro	E8 Ser-Ser	E9 Ser-Tyr	E10 Ser-Val	E11 Thr-Ala	E12 Thr-Arg
F1 Thr-Glu	F2 Thr-Gly	F3 Thr-Leu	F4 Thr-Met	F5 Thr-Pro	F6 Trp-Ala	F7 Trp-Arg	F8 Trp-Asp	F9 Trp-Glu	F10 Trp-Gly	F11 Trp-Leu	F12 Trp-Lys
G1 Trp-Phe	G2 Trp-Ser	G3 Trp-Trp	G4 Trp-Tyr	G5 Tyr-Ala	G6 Tyr-Gln	G7 Tyr-Glu	G8 Tyr-Gly	G9 Tyr-His	G10 Tyr-Leu	G11 Tyr-Lys	G12 Tyr-Phe
H1 Tyr-Trp	H2 Tyr-Tyr	H3 Val-Arg	H4 Val-Asn	H5 Val-Asp	H6 Val-Gly	H7 Val-His	H8 Val-Ile	H9 Val-Leu	H10 Val-Tyr	H11 Val-Val	H12 Y-Glu-Gly

PM8 MicroPlate™ Peptide Nitrogen Sources

A1 Negative Control	A2 Positive Control: L- Glutamine	A3 Ala-Asp	A4 Ala-Gln	A5 Ala-Ile	A6 Ala-Met	A7 Ala-Val	A8 Asp-Ala	A9 Asp-Gln	A10 Asp-Gly	A11 Glu-Ala	A12 Gly-Asn
B1 Gly-Asp	B2 Gly-Ile	B3 His-Ala	B4 His-Glu	B5 His-His	B6 Ile-Asn	B7 Ile-Leu	B8 Leu-Asn	B9 Leu-His	B10 Leu-Pro	B11 Leu-Tyr	B12 Lys-Asp
C1 Lys-Gly	C2 Lys-Met	C3 Met-Thr	C4 Met-Tyr	C5 Phe-Asp	C6 Phe-Glu	C7 Gln-Glu	C8 Phe-Met	C9 Phe-Tyr	C10 Phe-Val	C11 Pro-Arg	C12 Pro-Asn
D1 Pro-Glu	D2 Pro-Ile	D3 Pro-Lys	D4 Pro-Ser	D5 Pro-Trp	D6 Pro-Val	D7 Ser-Asn	D8 Ser-Asp	D9 Ser-Gln	D10 Ser-Glu	D11 Thr-Asp	D12 Thr-Gln
E1 Thr-Phe	E2 Thr-Ser	E3 Trp-Val	E4 Tyr-Ile	E5 Tyr-Val	E6 Val-Ala	E7 Val-Gln	E8 Val-Glu	E9 Val-Lys	E10 Val-Met	E11 Val-Phe	E12 Val-Pro
F1 Val-Ser	F2 β -Ala-Ala	F3 β -Ala-Gly	F4 β -Ala-His	F5 Met- β -Ala	F6 β -Ala-Phe	F7 D-Ala-D-Ala	F8 D-Ala-Gly	F9 D-Ala-Leu	F10 D-Leu-D-Leu	F11 D-Leu-Gly	F12 D-Leu-Tyr
G1 Y-Glu-Gly	G2 Y-D-Glu-Gly	G3 Gly-D-Ala	G4 Gly-D-Asp	G5 Gly-D-Ser	G6 Gly-D-Thr	G7 Gly-D-Val	G8 Leu- β -Ala	G9 Leu-D-Leu	G10 Phe- β -Ala	G11 Ala-Ala-Ala	G12 D-Ala-Gly-Gly
H1 Gly-Gly-Ala	H2 Gly-Gly-D-Leu	H3 Gly-Gly-Gly	H4 Gly-Gly-Ile	H5 Gly-Gly-Leu	H6 Gly-Gly-Phe	H7 Val-Tyr-Val	H8 Gly-Phe-Phe	H9 Leu-Gly-Gly	H10 Leu-Leu-Leu	H11 Phe-Gly-Gly	H12 Tyr-Gly-Gly

Abb. 8. 4: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 7 und 8

PM9 MicroPlate™ Osmolytes

A1 NaCl 1%	A2 NaCl 2%	A3 NaCl 3%	A4 NaCl 4%	A5 NaCl 5%	A6 NaCl 5.5%	A7 NaCl 6%	A8 NaCl 6.5%	A9 NaCl 7%	A10 NaCl 8%	A11 NaCl 9%	A12 NaCl 10%
B1 NaCl 6%	B2 NaCl 6% + Betaine	B3 NaCl 6% + N-N Dimethyl glycine	B4 NaCl 6% + Sarcosine	B5 NaCl 6% + Dimethyl sulphonyl propionate	B6 NaCl 6% + MOPS	B7 NaCl 6% + Ectoine	B8 NaCl 6% + Choline	B9 NaCl 6% + Phosphoryl choline	B10 NaCl 6% + Creatine	B11 NaCl 6% + Creatinine	B12 NaCl 6% + L- Carnitine
C1 NaCl 6% + KCl	C2 NaCl 6% + L-proline	C3 NaCl 6% + N-Acetyl L-glutamine	C4 NaCl 6% + β-Glutamic acid	C5 NaCl 6% + γ-Amino -n- butyric acid	C6 NaCl 6% + Glutathione	C7 NaCl 6% + Glycerol	C8 NaCl 6% + Trehalose	C9 NaCl 6% + Trimethylamine -N-oxide	C10 NaCl 6% + Trimethylamine	C11 NaCl 6% + Octopine	C12 NaCl 6% + Trigonelline
D-1 Potassium chloride 3%	D2 Potassium chloride 4%	D3 Potassium chloride 5%	D4 Potassium chloride 6%	D5 Sodium sulfate 2%	D6 Sodium sulfate 3%	D7 Sodium sulfate 4%	D8 Sodium sulfate 5%	D9 Ethylene glycol 5%	D10 Ethylene glycol 10%	D11 Ethylene glycol 15%	D12 Ethylene glycol 20%
E1 Sodium formate 1%	E2 Sodium formate 2%	E3 Sodium formate 3%	E4 Sodium formate 4%	E5 Sodium formate 5%	E6 Sodium formate 6%	E7 Urea 2%	E8 Urea 3%	E9 Urea 4%	E10 Urea 5%	E11 Urea 6%	E12 Urea 7%
F1 Sodium Lactate 1%	F2 Sodium Lactate 2%	F3 Sodium Lactate 3%	F4 Sodium Lactate 4%	F5 Sodium Lactate 5%	F6 Sodium Lactate 6%	F7 Sodium Lactate 7%	F8 Sodium Lactate 8%	F9 Sodium Lactate 9%	F10 Sodium Lactate 10%	F11 Sodium Lactate 11%	F12 Sodium Lactate 12%
G1 Sodium Phosphate pH 7 20mM	G2 Sodium Phosphate pH 7 50mM	G3 Sodium Phosphate pH 7 100mM	G4 Sodium Phosphate pH 7 200mM	G5 Sodium Benzoate pH 5.2 20mM	G6 Sodium Benzoate pH 5.2 50mM	G7 Sodium Benzoate pH5.2 100mM	G8 Sodium Benzoate pH 5.2 200mM	G9 Ammonium sulfate pH8 10mM	G10 Ammonium sulfate pH 8 20mM	G11 Ammonium sulfate pH 8 50mM	G12 Ammonium sulfate pH8 100mM
H1 Sodium Nitrate 10mM	H2 Sodium Nitrate 20mM	H3 Sodium Nitrate 40mM	H4 Sodium Nitrate 60mM	H5 Sodium Nitrate 80mM	H6 Sodium Nitrate 100mM	H7 Sodium Nitrite 10mM	H8 Sodium Nitrite 20mM	H9 Sodium Nitrite 40mM	H10 Sodium Nitrite 60mM	H11 Sodium Nitrite 80mM	H12 Sodium Nitrite 100mM

PM10 MicroPlate™ pH

A1 pH 3.5	A2 pH 4	A3 pH 4.5	A4 pH 5	A5 pH 5.5	A6 pH 6	A7 pH 7	A8 pH 8	A9 pH 8.5	A10 pH 9	A11 pH 9.5	A12 pH 10
B1 pH 4.5	B2 pH 4.5 + L-Alanine	B3 pH 4.5 + L-Arginine	B4 pH 4.5 + L-Asparagine	B5 pH 4.5 + L-Aspartic Acid	B6 pH 4.5 + L-Glutamic Acid	B7 pH 4.5 + L-Glutamine	B8 pH 4.5 + Glycine	B9 pH 4.5 + L-Histidine	B10 pH 4.5 + L-Isoleucine	B11 pH 4.5 + L-Leucine	B12 pH 4.5 + L-Lysine
C1 pH 4.5 + L-Methionine	C2 pH 4.5 + L- Phenylalanine	C3 pH 4.5 + L-Proline	C4 pH 4.5 + L-Serine	C5 pH 4.5 + L-Threonine	C6 pH 4.5 + L-Tryptophan	C7 pH 4.5 + L-Tyrosine	C8 pH 4.5 + L-Valine	C9 pH 4.5 + Hydroxy- L-Proline	C10 pH 4.5 + L-Ornithine	C11 pH 4.5 + L-Homoarginine	C12 pH 4.5 + L-Homoserine
D-1 pH 4.5 + Anthrillilic acid	D2 pH 4.5 + L-Norleucine	D3 pH 4.5 + L-Norvaline	D4 pH 4.5 + α- Amino-N- butyric acid	D5 pH 4.5 + p- Aminobenzoate	D6 pH 4.5 + L-Cysteic acid	D7 pH 4.5 + D-Lysine	D8 pH 4.5 + S-Hydroxy Lysine	D9 pH 4.5 + 5-Hydroxy Tryptophan	D10 pH 4.5 + D, L-Diamino pimelic acid	D11 pH 4.5 + Trimethyl amine-N-oxide	D12 pH 4.5 + Urea
E1 pH 9.5	E2 pH 9.5 + L-Alanine	E3 pH 9.5 + L-Arginine	E4 pH 9.5 + L-Asparagine	E5 pH 9.5 + L-Aspartic Acid	E6 pH 9.5 + L-Glutamic Acid	E7 pH 9.5 + L-Glutamine	E8 pH 9.5 + Glycine	E9 pH 9.5 + L-Histidine	E10 pH 9.5 + L-Isoleucine	E11 pH 9.5 + L-Leucine	E12 pH 9.5 + L-Lysine
F1 pH 9.5 + L-Methionine	F2 pH 9.5 + L- Phenylalanine	F3 pH 9.5 + L-Proline	F4 pH 9.5 + L-Serine	F5 pH 9.5 + L-Threonine	F6 pH 9.5 + L-Tryptophan	F7 pH 9.5 + L-Tyrosine	F8 pH 9.5 + L-Valine	F9 pH 9.5 + Hydroxy- L-Proline	F10 pH 9.5 + L-Ornithine	F11 pH 9.5 + L-Homoarginine	F12 pH 9.5 + L-Homoserine
G1 pH 9.5 + Anthrillilic acid	G2 pH 9.5 + L-Norleucine	G3 pH 9.5 + L-Norvaline	G4 pH 9.5 + Agmatine	G5 pH 9.5 + Cadaverine	G6 pH 9.5 + Putrescine	G7 pH 9.5 + Histamine	G8 pH 9.5 + Phenylethylamin e	G9 pH 9.5 + Tyramine	G10 pH 9.5 + Creatine	G11 pH 9.5 + Trimethyl amine-N-oxide	G12 pH 9.5 + Urea
H1 X-Caprylate	H2 X-α-D- Glucoside	H3 X-β-D- Glucoside	H4 X-α-D- Galactoside	H5 X-β-D- Galactoside	H6 X-α- D- Glucuronide	H7 X-β- D- Glucuronide	H8 X-β-D- Glucosaminide	H9 X-β-D- Galactosaminid e	H10 X-α-D- Mannoside	H11 X-PO4	H12 X-SO4

Abb. 8.5: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 9 und 10

PM11C MicroPlate™											
A1 Amikacin	A2 Amikacin	A3 Amikacin	A4 Amikacin	A5 Chlortetracycline	A6 Chlortetracycline	A7 Chlortetracycline	A8 Chlortetracycline	A9 Lincomycin	A10 Lincomycin	A11 Lincomycin	A12 Lincomycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Amoxicillin	B2 Amoxicillin	B3 Amoxicillin	B4 Amoxicillin	B5 Cloxacillin	B6 Cloxacillin	B7 Cloxacillin	B8 Cloxacillin	B9 Lomefloxacin	B10 Lomefloxacin	B11 Lomefloxacin	B12 Lomefloxacin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Bleomycin	C2 Bleomycin	C3 Bleomycin	C4 Bleomycin	C5 Colistin	C6 Colistin	C7 Colistin	C8 Colistin	C9 Minocycline	C10 Minocycline	C11 Minocycline	C12 Minocycline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Capreomycin	D2 Capreomycin	D3 Capreomycin	D4 Capreomycin	D5 Demeclacycline	D6 Demeclacycline	D7 Demeclacycline	D8 Demeclacycline	D9 Nafcilin	D10 Nafcilin	D11 Nafcilin	D12 Nafcilin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Cefazolin	E2 Cefazolin	E3 Cefazolin	E4 Cefazolin	E5 Enoxacin	E6 Enoxacin	E7 Enoxacin	E8 Enoxacin	E9 Nalidixic acid	E10 Nalidixic acid	E11 Nalidixic acid	E12 Nalidixic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Chloramphenicol	F2 Chloramphenicol	F3 Chloramphenicol	F4 Chloramphenicol	F5 Erythromycin	F6 Erythromycin	F7 Erythromycin	F8 Erythromycin	F9 Neomycin	F10 Neomycin	F11 Neomycin	F12 Neomycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Ceftriaxone	G2 Ceftriaxone	G3 Ceftriaxone	G4 Ceftriaxone	G5 Gentamicin	G6 Gentamicin	G7 Gentamicin	G8 Gentamicin	G9 Potassium tellurite	G10 Potassium tellurite	G11 Potassium tellurite	G12 Potassium tellurite
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Cephalothin	H2 Cephalothin	H3 Cephalothin	H4 Cephalothin	H5 Kanamycin	H6 Kanamycin	H7 Kanamycin	H8 Kanamycin	H9 Ofloxacin	H10 Ofloxacin	H11 Ofloxacin	H12 Ofloxacin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM12B MicroPlate™											
A1 Penicillin G	A2 Penicillin G	A3 Penicillin G	A4 Penicillin G	A5 Tetracycline	A6 Tetracycline	A7 Tetracycline	A8 Tetracycline	A9 Carbenicillin	A10 Carbenicillin	A11 Carbenicillin	A12 Carbenicillin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Oxacillin	B2 Oxacillin	B3 Oxacillin	B4 Oxacillin	B5 Penimepicycline	B6 Penimepicycline	B7 Penimepicycline	B8 Penimepicycline	B9 Polymyxin B	B10 Polymyxin B	B11 Polymyxin B	B12 Polymyxin B
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Paromomycin	C2 Paromomycin	C3 Paromomycin	C4 Paromomycin	C5 Vancomycin	C6 Vancomycin	C7 Vancomycin	C8 Vancomycin	C9 D,L-Serine hydroxamate	C10 D,L-Serine hydroxamate	C11 D,L-Serine hydroxamate	C12 D,L-Serine hydroxamate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Sisomicin	D2 Sisomicin	D3 Sisomicin	D4 Sisomicin	D5 Sulfamethazine	D6 Sulfamethazine	D7 Sulfamethazine	D8 Sulfamethazine	D9 Novobiocin	D10 Novobiocin	D11 Novobiocin	D12 Novobiocin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 2,4-Diamino-6,7-disopropyl-pteridine	E2 2,4-Diamino-6,7-disopropyl-pteridine	E3 2,4-Diamino-6,7-disopropyl-pteridine	E4 2,4-Diamino-6,7-disopropyl-pteridine	E5 Sulfadiazine	E6 Sulfadiazine	E7 Sulfadiazine	E8 Sulfadiazine	E9 Benzethonium chloride	E10 Benzethonium chloride	E11 Benzethonium chloride	E12 Benzethonium chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Tobramycin	F2 Tobramycin	F3 Tobramycin	F4 Tobramycin	F5 Sulfathiazole	F6 Sulfathiazole	F7 Sulfathiazole	F8 Sulfathiazole	F9 5-Fluoroorotic acid	F10 5-Fluoroorotic acid	F11 5-Fluoroorotic acid	F12 5-Fluoroorotic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Spectinomycin	G2 Spectinomycin	G3 Spectinomycin	G4 Spectinomycin	G5 Sulfamethoxazole	G6 Sulfamethoxazole	G7 Sulfamethoxazole	G8 Sulfamethoxazole	G9 L-Aspartic-β-hydroxamate	G10 L-Aspartic-β-hydroxamate	G11 L-Aspartic-β-hydroxamate	G12 L-Aspartic-β-hydroxamate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Spiramycin	H2 Spiramycin	H3 Spiramycin	H4 Spiramycin	H5 Rifampicin	H6 Rifampicin	H7 Rifampicin	H8 Rifampicin	H9 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H10 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H11 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H12 Dodecyltrimethyl ammonium bromide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

Abb. 8. 6: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 11 und 12

PM13B MicroPlate™

A1 Ampicillin	A2 Ampicillin	A3 Ampicillin	A4 Ampicillin	A5 Dequalinium chloride	A6 Dequalinium chloride	A7 Dequalinium chloride	A8 Dequalinium chloride	A9 Nickel chloride	A10 Nickel chloride	A11 Nickel chloride	A12 Nickel chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Azlocillin	B2 Azlocillin	B3 Azlocillin	B4 Azlocillin	B5 2,2'-Dipyridyl	B6 2,2'-Dipyridyl	B7 2,2'-Dipyridyl	B8 2,2'-Dipyridyl	B9 Oxolinic acid	B10 Oxolinic acid	B11 Oxolinic acid	B12 Oxolinic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 6-Mercaptopurine	C2 6-Mercaptopurine	C3 6-Mercaptopurine	C4 6-Mercaptopurine	C5 Doxycycline	C6 Doxycycline	C7 Doxycycline	C8 Doxycycline	C9 Potassium chromate	C10 Potassium chromate	C11 Potassium chromate	C12 Potassium chromate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Cefuroxime	D2 Cefuroxime	D3 Cefuroxime	D4 Cefuroxime	D5 5-Fluorouracil	D6 5-Fluorouracil	D7 5-Fluorouracil	D8 5-Fluorouracil	D9 Roflitracycline	D10 Roflitracycline	D11 Roflitracycline	D12 Roflitracycline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Cytosine arabinoside	E2 Cytosine arabinoside	E3 Cytosine arabinoside	E4 Cytosine arabinoside	E5 Geneticin (G418)	E6 Geneticin (G418)	E7 Geneticin (G418)	E8 Geneticin (G418)	E9 Ruthenium red	E10 Ruthenium red	E11 Ruthenium red	E12 Ruthenium red
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Cesium chloride	F2 Cesium chloride	F3 Cesium chloride	F4 Cesium chloride	F5 Glycine	F6 Glycine	F7 Glycine	F8 Glycine	F9 Thallium (I) acetate	F10 Thallium (I) acetate	F11 Thallium (I) acetate	F12 Thallium (I) acetate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Cobalt chloride	G2 Cobalt chloride	G3 Cobalt chloride	G4 Cobalt chloride	G5 Manganese (II) chloride	G6 Manganese (II) chloride	G7 Manganese (II) chloride	G8 Manganese (II) chloride	G9 Trifluoperazine	G10 Trifluoperazine	G11 Trifluoperazine	G12 Trifluoperazine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Cupric chloride	H2 Cupric chloride	H3 Cupric chloride	H4 Cupric chloride	H5 Moxalactam	H6 Moxalactam	H7 Moxalactam	H8 Moxalactam	H9 Tylosin	H10 Tylosin	H11 Tylosin	H12 Tylosin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM14A MicroPlate™

A1 Acriflavine	A2 Acriflavine	A3 Acriflavine	A4 Acriflavine	A5 Furaltadone	A6 Furaltadone	A7 Furaltadone	A8 Furaltadone	A9 Sanguinarine	A10 Sanguinarine	A11 Sanguinarine	A12 Sanguinarine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 9-Aminoacridine	B2 9-Aminoacridine	B3 9-Aminoacridine	B4 9-Aminoacridine	B5 Fusaric acid	B6 Fusaric acid	B7 Fusaric acid	B8 Fusaric acid	B9 Sodium arsenate	B10 Sodium arsenate	B11 Sodium arsenate	B12 Sodium arsenate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Boric Acid	C2 Boric Acid	C3 Boric Acid	C4 Boric Acid	C5 1-Hydroxypyridine- 2-thione	C6 1-Hydroxypyridine- 2-thione	C7 1-Hydroxypyridine- 2-thione	C8 1-Hydroxypyridine- 2-thione	C9 Sodium cyanate	C10 Sodium cyanate	C11 Sodium cyanate	C12 Sodium cyanate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Cadmium chloride	D2 Cadmium chloride	D3 Cadmium chloride	D4 Cadmium chloride	D5 Iodoacetate	D6 Iodoacetate	D7 Iodoacetate	D8 Iodoacetate	D9 Sodium dichromate	D10 Sodium dichromate	D11 Sodium dichromate	D12 Sodium dichromate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Cefoxitin	E2 Cefoxitin	E3 Cefoxitin	E4 Cefoxitin	E5 Nitrofurantoin	E6 Nitrofurantoin	E7 Nitrofurantoin	E8 Nitrofurantoin	E9 Sodium metaborate	E10 Sodium metaborate	E11 Sodium metaborate	E12 Sodium metaborate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Chloramphenicol	F2 Chloramphenicol	F3 Chloramphenicol	F4 Chloramphenicol	F5 Piperacillin	F6 Piperacillin	F7 Piperacillin	F8 Piperacillin	F9 Sodium metavanadate	F10 Sodium metavanadate	F11 Sodium metavanadate	F12 Sodium metavanadate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Chelerythrine	G2 Chelerythrine	G3 Chelerythrine	G4 Chelerythrine	G5 Carbenicillin	G6 Carbenicillin	G7 Carbenicillin	G8 Carbenicillin	G9 Sodium Nitrite	G10 Sodium Nitrite	G11 Sodium Nitrite	G12 Sodium Nitrite
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 EGTA	H2 EGTA	H3 EGTA	H4 EGTA	H5 Promethazine	H6 Promethazine	H7 Promethazine	H8 Promethazine	H9 Sodium orthovanadate	H10 Sodium orthovanadate	H11 Sodium orthovanadate	H12 Sodium orthovanadate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

Abb. 8. 7: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 13 und 14

PM15B MicroPlate™

A1 Procaine	A2 Procaine	A3 Procaine	A4 Procaine	A5 Guanidine hydrochloride	A6 Guanidine hydrochloride	A7 Guanidine hydrochloride	A8 Guanidine hydrochloride	A9 Cefmetazole	A10 Cefmetazole	A11 Cefmetazole	A12 Cefmetazole
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 D-Cycloserine	B2 D-Cycloserine	B3 D-Cycloserine	B4 D-Cycloserine	B5 EDTA	B6 EDTA	B7 EDTA	B8 EDTA	B9 5,7-Dichloro-8- hydroxy-quinoline	B10 5,7-Dichloro-8- hydroxy-quinoline	B11 5,7-Dichloro-8- hydroxy-quinoline	B12 5,7-Dichloro-8- hydroxy-quinoline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 5,7-Dichloro-8- hydroxy-quinoline	C2 5,7-Dichloro-8- hydroxy-quinoline	C3 5,7-Dichloro-8- hydroxy-quinoline	C4 5,7-Dichloro-8- hydroxy-quinoline	C5 Fusidic acid	C6 Fusidic acid	C7 Fusidic acid	C8 Fusidic acid	C9 1,10- Phenanthroline	C10 1,10- Phenanthroline	C11 1,10- Phenanthroline	C12 1,10- Phenanthroline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Phleomycin	D2 Phleomycin	D3 Phleomycin	D4 Phleomycin	D5 Domiphen bromide	D6 Domiphen bromide	D7 Domiphen bromide	D8 Domiphen bromide	D9 Nordihydroguai- retic acid	D10 Nordihydroguai- retic acid	D11 Nordihydroguai- retic acid	D12 Nordihydroguai- retic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Alexidine	E2 Alexidine	E3 Alexidine	E4 Alexidine	E5 Nitrofurazone	E6 Nitrofurazone	E7 Nitrofurazone	E8 Nitrofurazone	E9 Methyl viologen	E10 Methyl viologen	E11 Methyl viologen	E12 Methyl viologen
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 3, 4- Dimethoxybenzyl alcohol	F2 3, 4- Dimethoxybenzyl alcohol	F3 3, 4- Dimethoxybenzyl alcohol	F4 3, 4- Dimethoxybenzyl alcohol	F5 Oleandomycin	F6 Oleandomycin	F7 Oleandomycin	F8 Oleandomycin	F9 Puromycin	F10 Puromycin	F11 Puromycin	F12 Puromycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 CCCP	G2 CCCP	G3 CCCP	G4 CCCP	G5 Sodium azide	G6 Sodium azide	G7 Sodium azide	G8 Sodium azide	G9 Menadione	G10 Menadione	G11 Menadione	G12 Menadione
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 2-Nitroimidazole	H2 2-Nitroimidazole	H3 2-Nitroimidazole	H4 2-Nitroimidazole	H5 Hydroxyurea	H6 Hydroxyurea	H7 Hydroxyurea	H8 Hydroxyurea	H9 Zinc chloride	H10 Zinc chloride	H11 Zinc chloride	H12 Zinc chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM16A MicroPlate™

A1 Cefotaxime	A2 Cefotaxime	A3 Cefotaxime	A4 Cefotaxime	A5 Phosphomycin	A6 Phosphomycin	A7 Phosphomycin	A8 Phosphomycin	A9 5-Chloro-7-iodo-8- hydroxy-quinoline	A10 5-Chloro-7-iodo-8- hydroxy-quinoline	A11 5-Chloro-7-iodo-8- hydroxy-quinoline	A12 5-Chloro-7-iodo-8- hydroxy-quinoline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Norfloxacin	B2 Norfloxacin	B3 Norfloxacin	B4 Norfloxacin	B5 Sulfanilamide	B6 Sulfanilamide	B7 Sulfanilamide	B8 Sulfanilamide	B9 Trimethoprim	B10 Trimethoprim	B11 Trimethoprim	B12 Trimethoprim
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Dichlofluanid	C2 Dichlofluanid	C3 Dichlofluanid	C4 Dichlofluanid	C5 Protamine sulfate	C6 Protamine sulfate	C7 Protamine sulfate	C8 Protamine sulfate	C9 Cetylpyridinium chloride	C10 Cetylpyridinium chloride	C11 Cetylpyridinium chloride	C12 Cetylpyridinium chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene	D2 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene	D3 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene	D4 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene	D5 Diamide	D6 Diamide	D7 Diamide	D8 Diamide	D9 Cinoxacin	D10 Cinoxacin	D11 Cinoxacin	D12 Cinoxacin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Streptomycin	E2 Streptomycin	E3 Streptomycin	E4 Streptomycin	E5 5-Azacytidine	E6 5-Azacytidine	E7 5-Azacytidine	E8 5-Azacytidine	E9 Rifamycin SV	E10 Rifamycin SV	E11 Rifamycin SV	E12 Rifamycin SV
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Potassium tellurite	F2 Potassium tellurite	F3 Potassium tellurite	F4 Potassium tellurite	F5 Sodium selenite	F6 Sodium selenite	F7 Sodium selenite	F8 Sodium selenite	F9 Aluminum sulfate	F10 Aluminum sulfate	F11 Aluminum sulfate	F12 Aluminum sulfate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Chromium chloride	G2 Chromium chloride	G3 Chromium chloride	G4 Chromium chloride	G5 Ferric chloride	G6 Ferric chloride	G7 Ferric chloride	G8 Ferric chloride	G9 L-Glutamic acid g-hydroxamate	G10 L-Glutamic acid g-hydroxamate	G11 L-Glutamic acid g-hydroxamate	G12 L-Glutamic acid g-hydroxamate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Glycine hydroxamate	H2 Glycine hydroxamate	H3 Glycine hydroxamate	H4 Glycine hydroxamate	H5 Chloroxylenol	H6 Chloroxylenol	H7 Chloroxylenol	H8 Chloroxylenol	H9 Sorbic Acid	H10 Sorbic Acid	H11 Sorbic Acid	H12 Sorbic Acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

Abb. 8. 8: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 15 und 16

PM17A MicroPlate™

A1 D-Serine	A2 D-Serine	A3 D-Serine	A4 D-Serine	A5 β-Chloro-L-alanine	A6 β-Chloro-L-alanine	A7 β-Chloro-L-alanine	A8 β-Chloro-L-alanine	A9 Thiosalicylate	A10 Thiosalicylate	A11 Thiosalicylate	A12 Thiosalicylate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Sodium salicylate	B2 Sodium salicylate	B3 Sodium salicylate	B4 Sodium salicylate	B5 Hygromycin B	B6 Hygromycin B	B7 Hygromycin B	B8 Hygromycin B	B9 Ethionamide	B10 Ethionamide	B11 Ethionamide	B12 Ethionamide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 4-Aminopyridine	C2 4-Aminopyridine	C3 4-Aminopyridine	C4 4-Aminopyridine	C5 Sulfachloro- pyridazine	C6 Sulfachloro- pyridazine	C7 Sulfachloro- pyridazine	C8 Sulfachloro- pyridazine	C9 Sulfamono- methoxine	C10 Sulfamono- methoxine	C11 Sulfamono- methoxine	C12 Sulfamono- methoxine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Oxycarboxin	D2 Oxycarboxin	D3 Oxycarboxin	D4 Oxycarboxin	D5 Aminotriazole	D6 Aminotriazole	D7 Aminotriazole	D8 Aminotriazole	D9 Chlorpromazine	D10 Chlorpromazine	D11 Chlorpromazine	D12 Chlorpromazine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Naproof	E2 Naproof	E3 Naproof	E4 Naproof	E5 Compound 48/80	E6 Compound 48/80	E7 Compound 48/80	E8 Compound 48/80	E9 Sodium tungstate	E10 Sodium tungstate	E11 Sodium tungstate	E12 Sodium tungstate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Lithium chloride	F2 Lithium chloride	F3 Lithium chloride	F4 Lithium chloride	F5 D,L-Methionine hydroxamate	F6 D,L-Methionine hydroxamate	F7 D,L-Methionine hydroxamate	F8 D,L-Methionine hydroxamate	F9 Tannic acid	F10 Tannic acid	F11 Tannic acid	F12 Tannic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Chlorambucil	G2 Chlorambucil	G3 Chlorambucil	G4 Chlorambucil	G5 Cefamandole	G6 Cefamandole	G7 Cefamandole	G8 Cefamandole	G9 Cefoperazone	G10 Cefoperazone	G11 Cefoperazone	G12 Cefoperazone
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Cefsulodin	H2 Cefsulodin	H3 Cefsulodin	H4 Cefsulodin	H5 Caffeine	H6 Caffeine	H7 Caffeine	H8 Caffeine	H9 Phenylarsine oxide	H10 Phenylarsine oxide	H11 Phenylarsine oxide	H12 Phenylarsine oxide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM18C MicroPlate™

A1 Ketoprofen	A2 Ketoprofen	A3 Ketoprofen	A4 Ketoprofen	A5 Pyrophosphate	A6 Pyrophosphate	A7 Pyrophosphate	A8 Pyrophosphate	A9 Thiamphenicol	A10 Thiamphenicol	A11 Thiamphenicol	A12 Thiamphenicol
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Trifluorothymidine	B2 Trifluorothymidine	B3 Trifluorothymidine	B4 Trifluorothymidine	B5 Pipemidic Acid	B6 Pipemidic Acid	B7 Pipemidic Acid	B8 Pipemidic Acid	B9 Azathioprine	B10 Azathioprine	B11 Azathioprine	B12 Azathioprine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Poly-L-lysine	C2 Poly-L-lysine	C3 Poly-L-lysine	C4 Poly-L-lysine	C5 Sulfisoxazole	C6 Sulfisoxazole	C7 Sulfisoxazole	C8 Sulfisoxazole	C9 Pentachlorophenol	C10 Pentachlorophenol	C11 Pentachlorophenol	C12 Pentachlorophenol
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Sodium m-arsenite	D2 Sodium m-arsenite	D3 Sodium m-arsenite	D4 Sodium m-arsenite	D5 Sodium bromate	D6 Sodium bromate	D7 Sodium bromate	D8 Sodium bromate	D9 Lidocaine	D10 Lidocaine	D11 Lidocaine	D12 Lidocaine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Sodium metasilicate	E2 Sodium metasilicate	E3 Sodium metasilicate	E4 Sodium metasilicate	E5 Sodium periodate	E6 Sodium periodate	E7 Sodium periodate	E8 Sodium periodate	E9 Antimony (III) chloride	E10 Antimony (III) chloride	E11 Antimony (III) chloride	E12 Antimony (III) chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Semicarbazide hydrochloride	F2 Semicarbazide hydrochloride	F3 Semicarbazide hydrochloride	F4 Semicarbazide hydrochloride	F5 Tinidazole	F6 Tinidazole	F7 Tinidazole	F8 Tinidazole	F9 Aztreonam	F10 Aztreonam	F11 Aztreonam	F12 Aztreonam
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Triclosan	G2 Triclosan	G3 Triclosan	G4 Triclosan	G5 Guanazole	G6 Guanazole	G7 Guanazole	G8 Guanazole	G9 Myricetin	G10 Myricetin	G11 Myricetin	G12 Myricetin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 5-Fluoro-5'- deoxyuridine	H2 5-Fluoro-5'- deoxyuridine	H3 5-Fluoro-5'- deoxyuridine	H4 5-Fluoro-5'- deoxyuridine	H5 2-Phenylphenol	H6 2-Phenylphenol	H7 2-Phenylphenol	H8 2-Phenylphenol	H9 Plumbagin	H10 Plumbagin	H11 Plumbagin	H12 Plumbagin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

Abb. 8. 9: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 17 und 18

PM19 MicroPlate™

A1 Josamycin	A2 Josamycin	A3 Josamycin	A4 Josamycin	A5 Gallic acid	A6 Gallic acid	A7 Gallic acid	A8 Gallic acid	A9 Coumarin	A10 Coumarin	A11 Coumarin	A12 Coumarin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Methyltriethylammonium chloride	B2 Methyltriethylammonium chloride	B3 Methyltriethylammonium chloride	B4 Methyltriethylammonium chloride	B5 Harmaline	B6 Harmaline	B7 Harmaline	B8 Harmaline	B9 2,4-Dinitrophenol	B10 2,4-Dinitrophenol	B11 2,4-Dinitrophenol	B12 2,4-Dinitrophenol
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Chlorhexidine	C2 Chlorhexidine	C3 Chlorhexidine	C4 Chlorhexidine	C5 Umbelliferone	C6 Umbelliferone	C7 Umbelliferone	C8 Umbelliferone	C9 Cinnamic acid	C10 Cinnamic acid	C11 Cinnamic acid	C12 Cinnamic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Disulfiram	D2 Disulfiram	D3 Disulfiram	D4 Disulfiram	D5 Iodonitro tetrazolium violet	D6 Iodonitro tetrazolium violet	D7 Iodonitro tetrazolium violet	D8 Iodonitro tetrazolium violet	D9 Phenyl-methylsulfonyl-fluoride (PMSF)	D10 Phenyl-methylsulfonyl-fluoride (PMSF)	D11 Phenyl-methylsulfonyl-fluoride (PMSF)	D12 Phenyl-methylsulfonyl-fluoride (PMSF)
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 FCCP	E2 FCCP	E3 FCCP	E4 FCCP	E5 D,L-Thiolic acid	E6 D,L-Thiolic acid	E7 D,L-Thiolic acid	E8 D,L-Thiolic acid	E9 Lawsone	E10 Lawsone	E11 Lawsone	E12 Lawsone
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Phenethicillin	F2 Phenethicillin	F3 Phenethicillin	F4 Phenethicillin	F5 Blasticidin S	F6 Blasticidin S	F7 Blasticidin S	F8 Blasticidin S	F9 Sodium caprylate	F10 Sodium caprylate	F11 Sodium caprylate	F12 Sodium caprylate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Lauryl sulfobetaine	G2 Lauryl sulfobetaine	G3 Lauryl sulfobetaine	G4 Lauryl sulfobetaine	G5 Dihydro-streptomycin	G6 Dihydro-streptomycin	G7 Dihydro-streptomycin	G8 Dihydro-streptomycin	G9 Hydroxylamine	G10 Hydroxylamine	G11 Hydroxylamine	G12 Hydroxylamine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Hexaminecobalt (III) Chloride	H2 Hexaminecobalt (III) Chloride	H3 Hexaminecobalt (III) Chloride	H4 Hexaminecobalt (III) Chloride	H5 Thioglycerol	H6 Thioglycerol	H7 Thioglycerol	H8 Thioglycerol	H9 Polymyxin B	H10 Polymyxin B	H11 Polymyxin B	H12 Polymyxin B
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM20B MicroPlate™

A1 Amiripityline	A2 Amiripityline	A3 Amiripityline	A4 Amiripityline	A5 Apramycin	A6 Apramycin	A7 Apramycin	A8 Apramycin	A9 Benserazide	A10 Benserazide	A11 Benserazide	A12 Benserazide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Orphenadrine	B2 Orphenadrine	B3 Orphenadrine	B4 Orphenadrine	B5 Propranolol	B6 Propranolol	B7 Propranolol	B8 Propranolol	B9 Tetrazolium violet	B10 Tetrazolium violet	B11 Tetrazolium violet	B12 Tetrazolium violet
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Thioridazine	C2 Thioridazine	C3 Thioridazine	C4 Thioridazine	C5 Atropine	C6 Atropine	C7 Atropine	C8 Atropine	C9 Ornidazole	C10 Ornidazole	C11 Ornidazole	C12 Ornidazole
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Proflavine	D2 Proflavine	D3 Proflavine	D4 Proflavine	D5 Ciprofloxacin	D6 Ciprofloxacin	D7 Ciprofloxacin	D8 Ciprofloxacin	D9 18-Crown-6 ether	D10 18-Crown-6 ether	D11 18-Crown-6 ether	D12 18-Crown-6 ether
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Crystal Violet	E2 Crystal Violet	E3 Crystal Violet	E4 Crystal Violet	E5 Iodine	E6 Iodine	E7 Iodine	E8 Iodine	E9 Hexachlorophene	E10 Hexachlorophene	E11 Hexachlorophene	E12 Hexachlorophene
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 4-Hydroxycoumarin	F2 4-Hydroxycoumarin	F3 4-Hydroxycoumarin	F4 4-Hydroxycoumarin	F5 Oxytetracycline	F6 Oxytetracycline	F7 Oxytetracycline	F8 Oxytetracycline	F9 Pridinol	F10 Pridinol	F11 Pridinol	F12 Pridinol
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Captan	G2 Captan	G3 Captan	G4 Captan	G5 3,5-Dinitrobenzene	G6 3,5-Dinitrobenzene	G7 3,5-Dinitrobenzene	G8 3,5-Dinitrobenzene	G9 8-Hydroxyquinoline	G10 8-Hydroxyquinoline	G11 8-Hydroxyquinoline	G12 8-Hydroxyquinoline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Patulin	H2 Patulin	H3 Patulin	H4 Patulin	H5 Tolyfluand	H6 Tolyfluand	H7 Tolyfluand	H8 Tolyfluand	H9 Troleandomycin	H10 Troleandomycin	H11 Troleandomycin	H12 Troleandomycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

Abb. 8. 10: Legende zu den PM-Mikrotiterplatten 19 und 20

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Ehrmann für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meine Promotion durchzuführen, für die Überlassung des interessanten Themas zur selbständigen Bearbeitung, sowie für seine fachliche und menschliche Unterstützung.

Außerdem danke ich Lars Vouillème, AG Volkmer, Institut für Medizinische Immunologie an der Charité Berlin, für die Herstellung und das *Screening* der Peptidbibliothek.

Weiterhin möchte ich allen Kollegen der AG Ehrmann für die stetige Hilfsbereitschaft, für interessante Diskussionen und besonders für die freundschaftliche Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Laboralltags danken.

Christiane Lütticke, Dr. Sonja Hasenbein, Dr. Annette Tennstädt und Simon Pöpsel danke ich für das rasche und sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre ständige Unterstützung in allen Lebenslagen.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Das Netzwerk der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle in *E. coli*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Juliane Weski befürworte.

Essen, den 21.4.2010

Prof. Dr. Michael Ehrmann

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 21.4.2010

Juliane Weski

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den 21.4. 2010

Juliane Weski